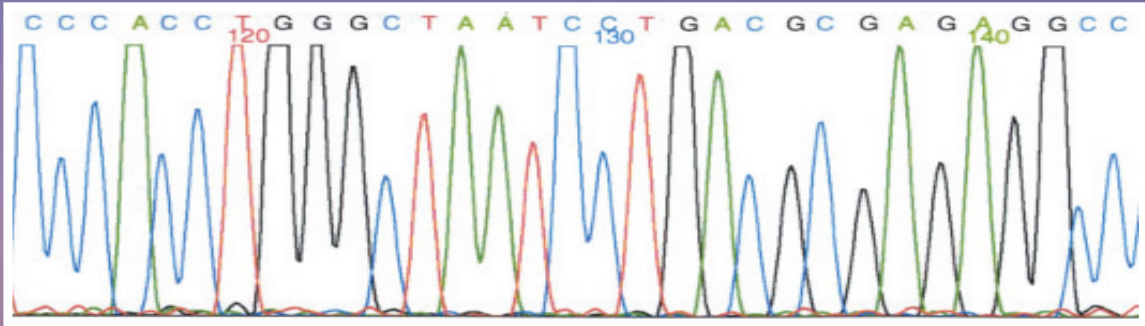


Identification of bacteria from the genus *Vibrio* associated to the clam culture. Characterization and pathogenesis.



Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas al cultivo de la almeja. Caracterización y patogénesis.



Roxana Beaz Hidalgo  
Septiembre 2008



**Departamento de Microbiología y Parasitología  
Facultad de Biología  
Universidad de Santiago de Compostela**

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEL GÉNERO *VIBRIO*  
ASOCIADAS AL CULTIVO DE LA ALMEJA.  
CARACTERIZACIÓN Y PATOGÉNESIS.

Roxana Beaz Hidalgo

2008





Departamento de Microbiología y Parasitología.  
Facultad de Biología.  
Universidad de Santiago de Compostela.

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEL GÉNERO *VIBRIO*  
ASOCIADAS AL CULTIVO DE LA ALMEJA.  
CARACTERIZACIÓN Y PATOGÉNESIS.

Memoria que presenta  
**Roxana Beaz Hidalgo**  
para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas  
(Doctorado Europeo)

Fdo: Roxana Beaz Hidalgo  
Santiago de Compostela,  
Julio 2008.



Departamento de Microbiología y Parasitología.  
Facultad de Biología.  
Universidad de Santiago de Compostela.

Jesús López Romalde, Profesor Titular, y Susana Prado Plana, Investigador Contratado,  
del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de  
Compostela

Informan:        que la presente Tesis Doctoral titulada: “Identificación de bacterias del  
                         género *Vibrio* asociadas al cultivo de la almeja. Caracterización y  
                         patogénesis.” que presenta Roxana Beaz Hidalgo para optar al grado de  
                         Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada en el Departamento de  
                         Microbiología y Parasitología bajo nuestra dirección, y considerando que  
                         se haya concluída, autorizamos su presentación para que pueda ser  
                         juzgada por el tribunal correspondiente

En Santiago de Compostela, a 28 de Julio de 2008

Dr. Jesús L. Romalde.

Dra. Susana Prado



Departamento de Microbiología y Parasitología.  
Facultad de Biología.  
Universidad de Santiago de Compostela.

Jesús López Romalde, Associate Professor, and Susana Prado Plana, Researcher, of the  
Department of Microbiology and Parasitology, University of Santiago de Compostela

Inform:           that this Ph.D. thesis entitled: “Identification of bacteria of the genus  
Vibrio associated with the culture of clams. Characterization and  
pathogenesis.” which Roxana Beaz Hidalgo presents to get the degree  
of Doctor in Biological Sciences, has been performed in the Department  
of Microbiology and Parasitology under our advice and, considering that  
it is finished, we authorised its defence to be judged by the correspondent  
commission.

Santiago de Compostela, July 28, 2008

Dr. Jesús L. Romalde.

Dra. Susana Prado



Este trabajo fue posible gracias a una subvención del Ministerio de Ciencia y Tecnología mediante el proyecto de investigación AGL2003-09307-C02-01.

Durante el desarrollo del mismo, he disfrutado de una beca de Formación de Personal Investigador (FPI) asociada a dicho proyecto.

#### Nota

Para cumplir con los requisitos necesarios para la obtención de la calificación de Doctorado Europeo, se ha incluido después de cada sección de esta Memoria, su correspondiente versión en lengua inglesa.

#### Note

To meet the requirements needed for the obtention of the mention of European doctorate, the correspondent versions in English have been included after each section of this Memory.

*“El Mar y Galicia. Galicia y el Mar...El Mar de Galicia, mi amor secreto.”*



*A Gus y Bodeón.*



## AGRADECIMIENTOS

*El éxito de un experimento es la interacción de un conjunto de elementos que son imprescindibles y te han ido ayudando en el proceso. Todos vosotros habéis sido fundamentales a lo largo de estos años, en conjunto me habéis enseñado, ayudado y apoyado para que haya logrado terminar esta Tesis. Por ello os quiero dedicar unas líneas a pesar de que lo que escriba se quede corto y no refleje todo cuanto vuestra ayuda haya significado para mí.*

*En primer lugar al segundo autor de esta Tesis, al Dr. Jesús L. Romalde, creo que él se conoce mejor que yo todo su contenido!!. Gracias por tu interés y dedicación en mi formación científica, por toda tu ayuda que todo lo que diga es poco, y por tu incansable y persistente paciencia, apoyo y confianza. Sin ti esta Tesis y todo cuanto implica no hubiera sido posible.*

*A la Dra. Susana Prado, sus conocimientos científicos también se ven plasmados a lo largo de esta Memoria. Gracias por enseñarme, tu apoyo, consejos y ayuda han sido imprescindibles en la etapa más difícil a lo largo de estos años en el laboratorio.*

*Al Dr. Juan L. Barja su incansable entusiasmo por la ciencia está al mismo nivel que sus conocimientos. Él es el “culpable” de esta Tesis. Gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar en el campo de la Microbiología que ahora se ha convertido en mi futuro.*

*A la Dra. Alicia Estévez Toranzo, su impecable trayectoria profesional es un ejemplo imposible a seguir. Gracias por haber confiado en mí y haberme hecho partícipe en todos los eventos del Departamento que me han ido guiando todo este tiempo.*

*A Sabela siempre dispuesta a anteponer su trabajo por el de los demás. Tu espíritu en el laboratorio es realmente increíble, en los momentos difíciles me has demostrado paciencia y apoyo. Mil gracias.*

*A Mari, no se puede decir que hayamos compartido horas en poyata pero sí años de lucha diaria en el laboratorio, por tantos momentos que has compartido conmigo, gracias.*

*A Ale y Ana, vuestra alegría en el laboratorio mantiene vivo el espíritu de trabajo con ilusión, además hacerme reír cuando estoy en el lab no es nada fácil!!, por esos momentos, gracias.*

*A Sol, desde el primer momento admiré tu efectividad y experiencia en el laboratorio, gracias por enseñarme mis primeros conocimientos en la Microbiología, tus conocimientos son como un libro de identificación bacteriana, siempre seguiré necesitando tu ayuda.*

*A la Dra. Beatriz Magariños, gracias por tu interés y ayuda desinteresadamente, tus palabras realmente me han ayudado muchísimo. A Celsa, siempre atenta por todos en el laboratorio, gracias por pelearte por conseguir lo que necesitaba en cada momento.*

*A compañeros que han compartido conmigo muchas horas de laboratorio, Rubén y Carmen. Nuria aunque contigo no fueron horas sí años. Y Manu, gracias por tu ayuda cuando la he necesitado. A Sonia, contigo trabajar fue realmente divertido, gracias por tu colaboración en una gran parte de esta Tesis.*

*A mi primo Carlos, que haría yo sin ti?. Estamos juntos para lo bueno y lo malo. Gracias por quererme y entenderme tantísimo.*

*A Rafa, desde Madrid me has animado en momentos críticos a seguir luchando, siempre asegurándote de que estuviera bien, contigo he vivido momentos increíbles, eso nunca se olvida.*

*A mi hermana Toyi, siempre estás ahí, momentos a tu lado son los más especiales en mi vida. A mi cuñadito Leo, que gran acierto, Toyi, fruto del tesoro de la familia: Tai. Simplemente hacéis que mi vida sea más feliz.*

*A mis abuelos Manuel y Victoria vuestra vida me ha dado fuerza e ilusión, ojalá logre algo de lo que vosotros habéis conseguido.*

*A mis queridísimas Abuela Ene y Charito sois mis madres en Galicia, por vuestra entera dedicación en cuerpo y alma, gracias, sin vosotros esto no hubiera sido posible. A mi abuelo Tono, siempre presente en mi mente y corazón.*

*No me puedo olvidar de mi ratita del laboratorio, Cleo, que es la que más horas ha compartido a mi lado escribiendo.*

*Y llegó el momento de agradecerles a mis padres, Roxana y Daniel, a quien les dedico esta Tesis. Incansable apoyo y dedicación, no tengo palabras.*

*He dejado para el final a la persona que más ha compartido conmigo mis momentos más difíciles y más alegres a lo largo de esta etapa, a Fredo. Gracias por darme todo tu amor, apoyo, por entenderme y escucharme tantas horas sobre Vibrios, A. salmonicida... Increíble. Gracias por todo.*

### **Publicaciones derivadas de la presente Tesis Doctoral.**

**Beaz-Hidalgo R., Cleenwerck I., Balboa S., De Wachter M., Thompson F. L., Swings J., De Vos P. & Romalde J. L. (2008).** Diversity of Vibrios associated with reared clams in Galicia (NW Spain). *Syst Appl Microbiol* **31**, 215-222.

**Beaz-Hidalgo, R., Cleenwerk, I., Balboa, S., Prado, S., de Vos, P. & Romalde, J. L. (2008).** *Vibrio breoganii* sp. nov., a non motile alginolytic marine bacterium within the *Vibrio halioticoli* clade. *Int J Syst Evol Microbiol*. (en prensa).

**Beaz-Hidalgo, R., Doce, A., Pascual, J., Toranzo, A. E. & Romalde, J. L. (2008).** *Vibrio gallaecicus* sp. nov. isolated from cultured clams in North Western Spain. *Syst Appl Microbiol*. (Revised Ms. SAM 3068).

**Beaz-Hidalgo, R., Doce, A., Balboa, S., Barja, J. L. & Romalde, J. L. (2008).** *Aliivibrio finisterrae* sp. nov. isolated from Manila clams, *Ruditapes philippinarum*. *Int J Syst Evol Microbiol*. (enviado).



## ABREVIATURAS

ADH	Arginina dihidrolasa
AM	Agar Marino
AFLP	Polimorfismos de amplificación del DNA
ATCC	American Type Culture Colletion
CECT	Colección Española de Cultivos puros
cel/ml	células por mililitro
CM	Caldo Marino
ECP	productos extracelulares
ERIC	secuencias consenso intergénicas repetitivas
G+C	contenido guanina citosina
LDC	lisina decarboxilasa
μm	micrómetro (micra)
nm	nanómetro
μM	micromolar
μl	microlitro
μg	microgramo
mg	miligramo
ng	nanogramo
ODC	ornitina decarboxilasa
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	revoluciones por minuto
RAPD	amplificación aleatoria del DNA
REP	secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas
RFLP	polimorfismos en longitud de fragmentos de restricción
SEM	microscopía electrónica de barrido
SS	solución salina
TAE	tampón acetato-EDTA
TEM	microscopía electrónica de transmisión
TCBS	Medio Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa

UFC

unidades formadoras de colonias

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>13</b>
1.1. La acuicultura mundial.	
15    1.2. El cultivo de moluscos bivalvos.	16
1.3. El cultivo de la almeja.	18
1.4. Microorganismos patógenos que afectan al cultivo de moluscos bivalvos.	20
1.4.1. Parásitos.	21
1.4.2. Virus.	27
1.4.3. Bacterias.	30
1.4.3.1. Bacterias patógenas de larvas de bivalvos.	30
1.4.3.2. Enfermedades bacterianas de juveniles y adultos.	33
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
<b>3. BACTERIAS ASOCIADAS AL CULTIVO DE LA ALMEJA</b>	<b>51</b>
3.1. INTRODUCCIÓN	53
3.1.1. Microbiota bacteriana asociada a bivalvos.	53
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	58
3.2.1. Muestreo y obtención de aislados bacterianos.	58
3.2.2. Caracterización fenotípica y análisis de fenones.	59
3.3. RESULTADOS	64
3.3.1. Evolución de la carga bacteriana en el tiempo.	64
3.3.2. Caracterización fenotípica de aislados bacterianos del género <i>Vibrio</i>	72
3.4. DISCUSIÓN	78
<b>4. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE AISLADOS DE <i>Vibrio</i></b>	<b>89</b>
4.1. INTRODUCCIÓN	91
4.1.1. Identificación fenotípica vs. la identificación genética.	91
4.1.2. AFLP: una técnica de tipado molecular.	93
4.1.3. AFLP: su uso en especies bacterianas.	96



4.1.4. Secuenciación del gen 16S rRNA y genes “housekeeping”	97
4.1.5. ERIC y REP PCR.	98
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	100
4.2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.	100
4.2.2. Extracción de DNA genómico.	100
4.2.3. Caracterización genética mediante la técnica de AFLP.	100
4.2.3.1. Preparación de muestras.	100
4.2.3.2. Reacciones de PCR.	102
4.2.3.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida.	103
4.2.3.4. “Tracking” y análisis numérico.	104
4.2.4. Secuenciación de especies no identificadas por AFLP.	104
4.2.4.1. Selección de especies no identificadas.	104
4.2.4.2. Secuenciación.	104
4.2.5. Tipado molecular mediante ERIC y REP-PCR.	107
4.2.5.1. Cepas bacterianas y extracción de DNA.	107
4.2.5.2. Cebadores y condiciones de amplificación.	107
4.3. RESULTADOS	109
4.3.1. Identificación de especies de <i>Vibrio</i> mediante la técnica de AFLP.	109
4.3.2. Comparación de la identificación fenotípica y genética.	110
4.3.3. Análisis filogenético y posiciones taxonómicas de cepas no identificadas por AFLP.	110
4.3.4. Análisis por ERIC y REP-PCR de las especies de <i>Vibrio</i> predominantes.	
122 4.3.4.1. <i>V. cyclitrophicus</i> .	122
4.3.4.2. <i>V. splendidus</i> .	124
4.3.4.3. <i>V. alginolyticus</i> y <i>V. diabolicus</i> .	128
4.4. DISCUSIÓN	131
<b>5. DESCRIPCIÓN DE TRES NUEVAS ESPECIES DE <i>Vibrionaceae</i></b>	<b>151</b>
5.1. INTRODUCCIÓN	153
5.1.1. Taxonomía del género <i>Vibrio</i> .	153
5.1.2. Una perspectiva global de los <i>Vibrios</i> en el medio acuático.	154

5.1.3. Especies del clado <i>Vibrio halioticoli</i> .	156
5.1.4. Especies del clado <i>Vibrio splendidus</i> .	158
5.1.5. Especies del clado <i>Aliivibrio fischeri</i> .	162
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	165
5.2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.	165
5.2.2. Caracterización fenotípica.	165
5.2.2.1. Metodología clásica.	165
5.2.2.2. Sistemas miniaturizados.	166
5.2.3. Microscopía electrónica.	167
5.2.4. Amplificación del DNA y secuenciación.	168
5.2.5. Determinación del contenido Guanina + Citosina e hibridación DNA-DNA.	168
5.2.6. Espectrometría de masas: MALDI-TOF-MS.	169
5.2.7. ERIC y REP-PCR.	170
5.3. RESULTADOS	170
5.3.1. <i>Vibrio breoganii</i> sp. nov.	170
5.3.1.1. Caracterización fenotípica.	170
5.3.1.2. Diferenciación fenotípica de especies cercanas.	171
5.3.1.3. Microscopía electrónica.	172
5.3.1.4. Análisis filogenético.	177
5.3.1.5. Determinación del contenido G + C e hibridación DNA-DNA.	183
5.3.1.6. MALDI-TOF-MS.	184
5.3.1.7. Análisis por ERIC y REP-PCR de <i>V. breoganii</i> sp. nov.	185
5.3.1.8. Descripción de <i>Vibrio breoganii</i> sp. nov.	188
5.3.2. <i>Vibrio gallaecicus</i> sp. nov.	189
5.3.2.1. Caracterización fenotípica.	189
5.3.2.2. Diferenciación fenotípica de especies cercanas.	193
5.3.2.3. Microscopía electrónica.	193
5.3.2.4. Análisis filogenético.	195
5.3.2.5. MALDI-TOF-MS.	200
5.3.2.6. Análisis por ERIC y REP-PCR de <i>V. gallaecicus</i> sp. nov.	202

	5.3.2.7. Descripción de <i>Vibrio gallaecicus</i> sp. nov.	205
	5.3.3. <i>Aliivibrio finisterrae</i> sp. nov.	206
	5.3.3.1. Caracterización fenotípica.	206
	5.3.3.2. Diferenciación fenotípica de especies cercanas.	207
	5.3.3.3. Microscopía electrónica.	
213	5.3.3.4. Análisis filogenético.	213
	5.3.3.5. MALDI-TOF-MS.	217
	5.3.3.6. Análisis por ERIC y REP PCR de <i>A. finisterrae</i> sp. nov.	219
	5.3.3.7. Descripción de <i>Aliivibrio finisterrae</i> sp. nov.	222
	5.5. DISCUSIÓN	222
 <b>6. VIBRIOS: DETERMINACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA</b>		
	<b>E INFECCIONES <i>in vivo</i>.</b>	<b>287</b>
	6.1. INTRODUCCIÓN	289
	6.2. MATERIALES Y MÉTODOS	292
	6.2.1. Selección de cepas bacterianas.	292
	6.2.2. Estudio de factores de virulencia extracelulares.	292
	6.2.2.1. Obtención de productos extracelulares.	292
	6.2.2.2. Caracterización de las actividades enzimáticas de los ECP <i>in vitro</i> .	292
	6.2.2.3. Cálculo de los niveles de proteínas.	293
	6.2.2.4. Citotoxicidad.	293
	6.2.3. Selección de cepas bacterianas para ensayos de infección.	294
	6.2.4. Infección <i>in vivo</i> en larvas de almeja japonesa.	295
	6.2.5. Infección <i>in vivo</i> en almejas adultas (fina y japonesa) por baño.	295
	6.2.6. Infección <i>in vivo</i> de almeja adulta (fina y japonesa) por inyección intravalvar.	296
	6.3. RESULTADOS	
297	6.3.1. Factores de virulencia.	297

6.3.2. Ensayos de patogenicidad en larvas de almeja.	307
6.3.3. Ensayos de patogenicidad en almejas adultas.	307
6.3.2.1. Infección por baño.	307
6.3.3.2. Infección por inyección intravalvar.	309
6.4. DISCUSIÓN	310
<b>7. CONSIDERACIONES FINALES</b>	<b>323</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>329</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>337</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>375</b>

## CONTENTS

<b>ABSTRACT</b>	<b>7</b>
<b>1. GENERAL INTRODUCTION</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJECTIVES</b>	<b>47</b>
<b>3. CHAPTER 3: BACTERIA ASSOCIATED WITH THE CULTURE OF CLAMS</b>	<b>81</b>
<b>4. CHAPTER 4: GENETIC CHARACTERIZATION OF <i>Vibrio</i> ISOLATES</b>	<b>137</b>
- ARTICLE: Diversity of vibrios associated with reared clams in Galicia (NW Spain)	139
- ERIC- and REP-PCR analysis of predominant <i>Vibrio</i> species identified by AFLP	147
<b>5. CHAPTER 5: DESCRIPTION OF THREE NEW SPECIES WITHIN <i>Vibrionaceae</i></b>	<b>227</b>
- ARTICLE: <i>Vibrio breoganii</i> sp. nov. a non motile alginolytic marine bacterium within the <i>Vibrio halioticoli</i> clade	229
- ARTICLE: <i>Vibrio gallaecicus</i> sp. nov. isolated from cultured clams in northwestern Spain	247
- ARTICLE: <i>Aliivibrio finisterrae</i> sp. nov. isolated from Manila clams ( <i>Ruditapes philippinarum</i> )	267
- <i>Vibrio breoganii</i> , <i>Vibrio gallaecicus</i> , and <i>Aliivibrio finisterrae</i> : electron microscopy, MALDI-TOF-MS and ERIC- and REP-PCR analysis	283
<b>6. CHAPTER 6</b>	<b>315</b>
VIBRIOS: STUDY OF PATHOGENICITY AND VIRULENCE FACTORS	317

<b>7. FINAL CONSIDERATIONS</b>	<b>323</b>
<b>8. CONCLUSIONS</b>	<b>333</b>
<b>9. REFERENCES</b>	<b>337</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>375</b>

**RESUMEN**

## RESUMEN

Algunas especies del género *Vibrio* son importantes patógenos bacterianos que afectan al cultivo de moluscos bivalvos. Las patologías causadas por vibrios en moluscos se conocen desde los años 60, sin embargo son escasos los estudios sistemáticos y en profundidad en especies de bivalvos distintos de la ostra plana (*Ostrea edulis*) o americana (*Crassostrea virginica*). Debido a los sucesivos episodios de altas mortalidades en poblaciones de almeja cultivada registrados en los últimos años en Galicia se hace necesario el estudio de la microbiota asociada con el fin de detectar posibles nuevos patógenos limitantes para el cultivo de este molusco bivalvo.

Los muestreos realizados a lo largo de 18 meses en 4 zonas geográficas distintas de Galicia demostraron una variación estacional en la carga bacteriana de las poblaciones cultivadas de almeja japonesa y fina (*Ruditapes philippinarum* y *R. decussatus*). Como era de esperar se observó un claro incremento en los niveles de bacterias totales y de vibrios en los meses más cálidos, ya que la temperatura aumenta el metabolismo y por tanto el crecimiento de estos microorganismos. Se aislaron un total de 768 vibrios. La caracterización bioquímica y fisiológica permitió una identificación preliminar de los aislados, agrupados en diversos fenones según sus perfiles. Los datos fenotípicos revelaron una gran diversidad de especies dentro del género, aunque hubo una clara dominancia de aislados del grupo *V. splendidus* constituyendo el 54% del total de las cepas. Otras especies abundantes fueron *V. lentus*, *V. alginolyticus*, *V. diazotrophicus* y *V. aestuarianus*.

Se seleccionaron 145 aislados representativos de los grupos fenotípicos para obtener una identificación más exacta mediante caracterización molecular. La técnica de polimorfismos de amplificación del DNA (AFLP) confirmó la elevada diversidad, permitiendo además esclarecer la identificación de muchos aislados que estaban enmascarados en el grupo de *V. splendidus* en la identificación fenotípica. Se observó que los datos de la identificación fenotípica y genética tan solo coincidieron en un 29,82%, demostrando que los métodos bioquímicos no son fiables en muchos casos



debido a la gran variabilidad intraespecífica en muchas características y a la falta de pruebas claves para diferenciar entre especies. Es por tanto necesario recurrir a un sistema de clasificación e identificación bacteriana basado en datos genéticos.

El 60,7% de los vibrios analizados por AFLP no lograron ser identificados a nivel de especie lo que apuntaba a la posible existencia de nuevas especies en el género. Se seleccionaron los 8 “clusters” no identificados de AFLP con mayor número de aislados, y se procedió a un estudio filogenético basado en la amplificación del gen 16S rRNA y cuatro genes “housekeeping”: *recA*, *rpoA*, *pyrH* y *atpA*.

Los datos de la técnica de análisis de secuencias multilocus (MLSA) revelaron la existencia de 8 posibles nuevas especies dentro del género *Vibrio*, 6 en la rama filogenética de *V. splendidus*, 1 en la rama de *V. haliotocoli* y 1 en la rama de *Aliivibrio fischeri*.

Una completa descripción bioquímica, los análisis filogenéticos de los 5 genes y los datos aportados por hibridación DNA-DNA permitieron la definición de tres nuevas especies dentro de la familia Vibrionaceae: *Vibrio breoganii* sp. nov., *Vibrio gallaecicus* sp. nov. y *Aliivibrio finisterrae* sp. nov.

Los análisis filogenéticos situaron a la especie *V. breoganii* en el grupo de *V. haliotocoli*, siendo las especies más cercanas *V. comitans*, *V. rarus* y *V. inusitatus*. Las células son pequeños bacilos inmóviles que carecen de flagelo. Está compuesta por 7 aislados fenotípicamente homogéneos con diferencias principalmente en la fermentación de azúcares. Los genes *atpA* y *pyrH* demostraron ser los mejores candidatos para diferenciar *V. breoganii* de las especies más cercanas. Se observó una variabilidad intraespecífica en los perfiles de ERIC-PCR, sin embargo los perfiles de REP-PCR presentaron altos porcentajes de similitud. La cepa tipo de *V. breoganii* es RD 15.11<sup>T</sup> (= CECT 7222<sup>T</sup> = LMG 23858<sup>T</sup>) aislada de almeja fina (*R. decussatus*).

## Resumen

---

Los datos del MLSA situaron a la nueva especie *V. gallaecicus* dentro del grupo polifilético de *V. splendidus*. La especie está compuesta por tres aislados fenotípicamente homogéneos. Todos los genes secuenciados menos el *atpA* situaron a los aislados de *V. gallaecicus* en una rama independiente del resto de las especies del grupo. Las secuencias concatenadas de los genes situaron a *V. gallaecicus* cerca de *V. chagasii*, la especie más distante del grupo. Los porcentajes de similitud en el gen 16S rRNA con las especies cercanas fueron inferiores al 97,3%. El gen *recA* es el más discriminativo para diferenciar la nueva especie de sus congéneres filogenéticos. Los tres aislados presentaron variabilidad intraespecífica en los perfiles obtenidos mediante ERIC y REP-PCR. La cepa tipo de *V. gallaecicus* es VB 8.9<sup>T</sup> (=CECT 7244<sup>T</sup>= LMG 24045<sup>T</sup>) aislada de almeja japonesa (*R. philippinarum*).

El grupo de *Aliivibrio finisterrae* está compuesto por 4 cepas de las cuales una se diferencia claramente desde el punto de vista fenotípico, como en la prueba de hidrólisis de la urea que es negativa para esta cepa. El congénere filogenético más cercano es *A. wodanis* con un 98,1% de similitud en el gen 16S rRNA, aunque los genes *recA* y *atpA* sitúan la especie más de cerca de *A. fischeri* y *A. salmonicida* respectivamente. En este caso el gen más discriminativo es el *recA*. La cepa tipo de *A. finisterrae* es CMJ 11.1<sup>T</sup> (= CECT 7228<sup>T</sup> = LMG 23869<sup>T</sup>) aislada de almeja japonesa (*R. philippinarum*).

En todos los casos, la técnica de MLSA y secuencias concatenadas de varios genes ofreció una mayor fiabilidad y solidez que la utilización de un solo gen para la determinación de la posición filogenética de las especies descritas.

El estudio de los productos extracelulares (ECP) de 57 cepas previamente caracterizadas por AFLP demostró, en general, una baja actividad enzimática y alta variabilidad en los perfiles. La mayor citotoxicidad en líneas celulares correspondió a cepas con ECPs con mayor actividad enzimática y concretamente proteolítica. Las cepas identificadas que mostraron mayor citotoxicidad fueron *V. crassostreae*, *V. chagasii*, *V. cyclitrophicus* y *V. diabolicus*.

En la cepa RD 8.15 (*V. splendidus*-like), perteneciente a uno de los grupos mayoritarios de AFLP no identificados, se detectaron actividades enzimáticas en los ECP así como una destrucción total en la línea celular SAF-1 y además, mostró virulencia en los ensayos de infección vía intravalvar en almeja adulta (fina y japonesa). La cepa no resultó virulenta en larvas de almeja japonesa.

En el análisis realizado de los ECP se observó actividad citotóxica en casi todas las cepas, sin embargo las cepas tipo de las tres nuevas especies y las 4 cepas de *Vibrio* sp. pertenecientes a los grupos de AFLP no identificados no resultaron virulentas en los ensayos realizados in vivo en larvas de almeja japonesa, ni en inoculaciones por baño en almeja adulta.

El presente trabajo ha confirmado la importancia de los métodos moleculares en la identificación de especies de la familia Vibrionaceae. Los datos obtenidos por AFLP señalan la existencia de numerosas especies dentro de esta familia aún no descritas. El estudio taxonómico, aunque centrado principalmente en tres líneas filogenéticas, sugiere que futuros estudios sobre las cepas descritas en esta Memoria llevarán a la descripción de nuevas especies de vibrios.

**ABSTRACT**

## ABSTRACT

A number of *Vibrio* species are important bacterial pathogens that seriously affect the culture of bivalve molluscs. The pathologies caused by vibrios in molluscs have been described since the 1960s; however there are still few systematic studies in bivalve species other than the European oyster (*Ostrea edulis*) or American oyster (*Crassostrea virginica*). During the last years, successive episodes of high mortalities have been registered in populations of cultivated clams in Galicia, which highlights the requirement of further studies on the associated microbiota with the purpose of detecting potential new pathogens limiting the culture of this bivalve mollusc.

Sampling was performed for a period of 18 months in 4 geographic areas of Galicia. Bacterial density in cultivated clams (*Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus*) showed a seasonal variation. Levels of total bacteria and vibrios increased during the warmer months as expected, since with temperature also increases the metabolism and thus the growth of these microorganisms. A total of 768 vibrios were isolated. Biochemical and physiological characterization allowed a preliminary identification of the isolates that were grouped in various phena according to their phenotypic profiles. Phenotypic data revealed a great diversity of species within genus, although there was a clear dominance of isolates belonging to the *V. splendidus* group, which constituted 54% of the total strains. Other predominant species were *V. lentus*, *V. alginolyticus*, *V. diazotrophicus* and *V. aestuarianus*.

A total of 145 isolates representatives of each phenotypic group were selected to obtain a more accurate identification based on molecular characterization. The technique of amplified fragment length polymorphism (AFLP) confirmed the high diversity, allowing the identification of many isolates that were masked in the group of *V. splendidus* after the phenotypic identification. It was noted that the data from phenotypic and genetic identification only agreed on 29.82%. This proved that, in many cases the biochemical methods are not reliable due to a high intraspecific variation in many phenotypic assays, as well as the absence of key characters useful to differentiate between related species.

Today genetic data is considered to be necessary for a bacterial classification and identification system.

The 60.70% of the vibrios analyzed by AFLP failed to be identified to species level; this indicated the possible existence of new species within the genus. Eight unidentified AFLP clusters with the highest number of isolates were selected for a phylogenetic study based on the amplification of the gene 16S rRNA and four housekeeping genes: *recA*, *rpoA*, *pyrH* y *atpA*.

Data from the analysis of multilocus sequences (MLSA) revealed the existence of 8 possible new species in the Family *Vibrionaceae*, 6 in the branch of *V. splendidus*, 1 in the branch of *V. haliotocoli* and 1 in the branch of *Aliivibrio fischeri*.

A complete description of the phenotypic profile, phylogenetic analysis of 5 genes and DNA-DNA hybridization data allowed the definition of three new species within the Family *Vibrionaceae*: *Vibrio breoganii* sp. nov., *Vibrio gallaecicus* sp. nov. and *Aliivibrio finisterrae* sp. nov.

Phylogenetic analysis situated the species *V. breoganii* in the group of *V. haliotocoli*, *V. comitans*, *V. rarus* and *V. inusitatus* being the closest relatives. Cells are non motile and non-flagellated rods. The species is composed of seven strains phenotypically homogeneous with differences mainly in the fermentation of carbohydrates. The genes *atpA* and *pyrH* proved to be the best candidates for the differentiation of *V. breoganii* from its closest relatives. Profiles of ERIC-PCR showed a high intraspecific variation among the strains; however REP-PCR profiles presented high percentages of similarity. The type strain of *V. breoganii* is RD 15.11<sup>T</sup> (= CECT 7222<sup>T</sup> = LMG 23858<sup>T</sup>) and was isolated from clam (*R. decussatus*).

MLSA data situated the new species *V. gallaecicus* in the polyphyletic group of *V. splendidus*. The species is composed of three isolates phenotypically homogeneous. All sequenced genes, except for the gene *atpA*, grouped the three strains in a separate

## Abstract

---

branch from the rest of the species in the group. Concatenated sequences of the genes placed *V. gallaecicus* close to *V. chagasii*, the most distant species within the group. Similarity percentages for the gene 16S rRNA with closest species were under 97.30%. *recA* was the most discriminatory gene for the differentiating of the new species from close phylogenetic relatives. The three isolates exhibited high intraspecific variability in the ERIC and REP-PCR profiles. The type strain of *V. gallaecicus* is VB 8.9<sup>T</sup> (=CECT 7244<sup>T</sup>= LMG 24045<sup>T</sup>) and was isolated from Manila clam (*R. philippinarum*).

The group of *Aliivibrio finisterrae* is composed of 4 strains from which one was clearly differentiated from the phenotypical point of view, such as in the urea hydrolysis test which was negative for this strain. The phylogenetic most related species is *A. wodanis* with 98.10% similarity in the gene 16S rRNA, but the genes *recA* and *atpA* situate the species *A. fischeri* and *A. salmonicida* in a closer position. In this case the most discriminatory gene is *recA*. The type strain of *A. finisterrae* is CMJ 11.1<sup>T</sup> (= CECT 7228<sup>T</sup> = LMG 23869<sup>T</sup>) isolated from Manila clam (*R. philippinarum*).

For the determination of the phylogenetic position of the species described, the MLSA technique based on concatenated sequences of various genes offered greater strength and reliability than the use of a single gene.

The study of the extracellular products (ECP) of 57 strains previously characterized by AFLP demonstrated, in general, a low enzymatic activity and high variability in the profiles. Cytotoxic activity of the strains was linked with ECP with high enzymatic activity, specifically proteolytic. The identified strains with highest cytotoxicity were *V. crassostreae*, *V. chagasii*, *V. cyclitrophicus* and *V. diabolicus*.

Enzymatic activities on the ECP and complete destruction of the cell line SAF-1 were detected on the strain RD 8.15 (*V. splendidus*-like, strain from one of the largest unidentified AFLP groups). The strain also showed virulence in the infection experiments by intra-valvar injection on adult clam (*R. philippinarum* and *R. decussatus*). The strain did not show any virulence in experiments with clam larvae.

In the analysis performed on ECP, cytotoxicity was observed in almost all the strains; however strains belonging to the 3 new species and the 4 *Vibrio* sp. which belong to the AFLP clusters not identified did not show virulence in the *in vivo* assays performed neither on Manila clam larvae nor in inoculation experiments on adult clam (*R. philippinarum* and *R. decussatus*).

The present work has confirmed that molecular methods are powerful tools for the interspecies study of the family *Vibrionaceae*. AFLP data points to the existence of numerous species within this family which have not yet been described. The taxonomic study, although focused mainly on three phylogenetic lines, suggests that future studies on the strains described in this work will lead to the description of new species of vibrios.



## **I. INTRODUCCIÓN**

# **1. INTRODUCCIÓN GENERAL.**

## **1.1. La acuicultura mundial.**

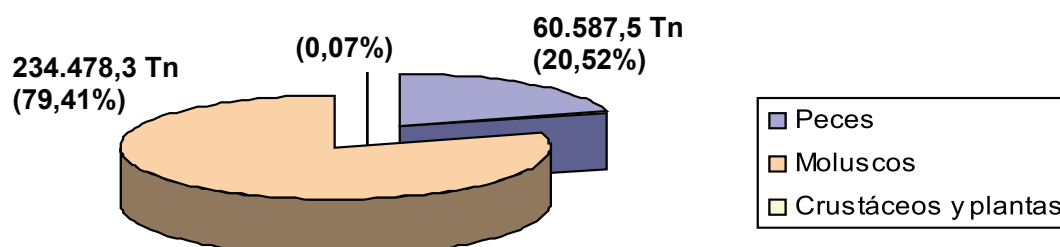
Los cultivos marinos son la única alternativa real y sostenible al progresivo retroceso de los recursos pesqueros en los caladeros de todo el mundo. Sin lugar a dudas la creciente tendencia global en el consumo de productos del mar va a continuar en el futuro. Por esta razón, la búsqueda de caminos alternativos para sustituir y complementar a los productos de la pesca es una tarea vital de los profesionales e investigadores relacionados con el mantenimiento, repoblación y cultivo de las especies marinas.

Históricamente los principales productores mundiales de la acuicultura han sido países de escasos recursos, con escasez de alimentos, que desarrollan la acuicultura como una actividad rural integrada en los sistemas de explotación existentes. China es el principal productor acuícola del mundo, otros países asiáticos como India, Vietnam y Tailandia se encuentran también en los primeros puestos del ranking mundial. A nivel europeo, Noruega ha sido y es el país con más desarrollo de la acuicultura marina. Fue pionero en los años sesenta y se ha consolidado en los últimos veinte años con el cultivo del salmón.

España inició su despegue en los años cuarenta y su desarrollo en los años setenta con tres cultivos característicos, el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) en las rías gallegas, la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) y el cultivo de peces en esteros gaditanos. A partir de la década de los 80, con la incorporación de nuevas tecnologías e industrialización, se introdujeron nuevas especies como la dorada (*Sparus aurata*), la lubina (*Dicentrarchus labrax*) y el rodaballo (*Scophthalmus maximus*). Hoy la acuicultura marina en España está consolidada, situándose en el puesto 16 dentro de los productores acuícolas del mundo y como segundo país Europeo del ranking, según datos de FAO (2004).

La producción española de acuicultura marina y continental en el año 2006 en la fase de engorde hasta la talla comercial, fue de 295.276,5 Tn, correspondiendo 60.587,5 Tn a peces, 234.478,3 Tn a moluscos, 209,5 Tn a crustáceos y 1,2 Tn a plantas acuáticas,

según datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPYA) (Figura 1.1).



**Figura 1.1.** Producción española de acuicultura marina y continental en el año 2006 en la fase de engorde.

La acuicultura es el sector de más rápido crecimiento en la industria de producción de alimentos. La FAO establece que la acuicultura produce más del 30% del pescado consumido en el mundo, un porcentaje que puede incrementarse a más del 50% para el año 2030. Este incremento será posible si se realizan investigaciones e innovaciones en todas las ramas de la acuicultura, como calidad de alimentos, genética, reproducción, tecnología, problemas patológicos y otros tópicos que requieren de un mayor desarrollo.

## **1.2. El cultivo de moluscos bivalvos.**

El arte del marisqueo es casi tan antiguo como la humanidad, en cuanto se refiere a la simple recogida de animales invertebrados marinos, con el fin de obtener el sustento diario. Pero lo que actualmente se entiende por mariscar (pescar o cultivar mariscos) se inició unos siglos antes de Cristo en China, siendo su protagonista la ostra, y se ha desarrollado hasta nuestros días fundamentalmente con miembros de la familia de los moluscos lamelibranquios.

Aunque los moluscos bivalvos se hayan cultivado durante siglos, los recientes avances tecnológicos han permitido incrementar su producción de forma significativa. Hoy,

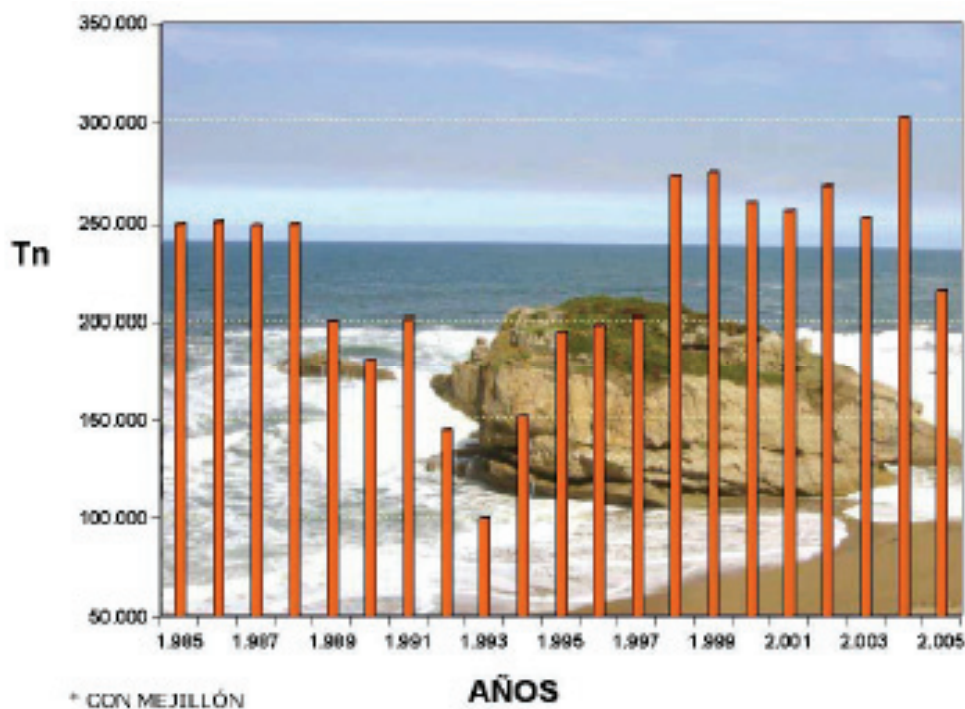
## Introducción

---

estos organismos constituyen una parte muy importante de la producción pesquera mundial. Entre los años 1991 y 2000 se observó un aumento constante de su producción, pasando de 6,3 millones de toneladas en 1991 a más de doble en el 2000, con 14.204.152 toneladas de bivalvos procedentes de pesca y de la acuicultura. En este año 2000 alrededor del 75% de la producción mundial procedía ya de cultivo.

En España la producción de moluscos se ha triplicado desde el año 1993, alcanzando los máximos valores en 2006 (Fig 1.2), siendo Galicia la principal productora (Tabla 1.3).

Un requisito esencial para cualquier actividad de cultivo es contar con semilla abundante, fiable y barata. Los criaderos ofrecen varias ventajas con respecto a la recolección en bancos naturales ya que pueden suministrar semilla según los requerimientos y cuando sea necesario. Las recientes mejoras tecnológicas han potenciado enormemente su fiabilidad y viabilidad económica, al producir semilla a precios competitivos.



**Figura 1.2.** Producción de moluscos en España (1985-2005) (MAPYA).

**Tabla 1.1.** Producción de bivalvos en dos fases de cultivo y por Comunidad Autónoma (MAPYA).

Especie <sup>a</sup>	Comunidad Autónoma	Preengorde-semillero (Kg)	Engorde a talla comercial (Kg)	Total talla comercial (Kg) (%)
Ostra	Galicia	6170320	3230233,96	3.234.733,96
	Comunidad Valenciana		4500	(1.38%)
Ostión japonés	Galicia	54510561	419575,77	
	Principado de Asturias	2800000	252000,00	1.251.115,77
	Cantabria		49520,00	(0.52%)
	Cataluña		530020,00	
Ostión	Andalucía	2500000	12068,00	12.068,00 (0.005%)
Zamburiña	Galicia	50000		
	Comunidad Valenciana		100,00	100,00
Mejillón	Galicia	1372408000	227342468,00	
	Cataluña		963617,00	
	Comunidad Valenciana		271540,00	228.884.683,00
	Islas Baleares		55580,00	(97.70%)
	Andalucía		251478,00	
Berberecho	Cataluña		1827,00	1827,00
Almeja japonesa	Galicia	54182174	574978,65	
	Cantabria	105000000	3500,00	717.216,65
	Cataluña		100573,00	(0.31%)
	Andalucía	4041472	38165,00	
Almeja fina	Galicia	5878357	143538,41	
	Cantabria	1900000	1500,00	158.594,41
	Cataluña		7235,00	(0.07%)
	Andalucía		6321,00	
Almeja babosa	Galicia	48763485	205897,32	205.897,32
	Cantabria	11300000		(0.09%)
<b>Total</b>				<b>234466236,00</b>

<sup>a</sup> Nombres científicos: ostra, *Ostrea edulis*; ostión japonés (ostra del Pacífico), *Crassostrea gigas*; ostión, *Coryphaea angulata*; zamburiña, *Chlamys varia*; mejillón, *Mytilus galloprovincialis*; berberecho, *Cerastoderma edule*, almeja japonesa, *Ruditapes philippinarum*; almeja fina, *R. decussatus*; almeja babosa, *Venerupis pullastra*.

### 1.3. El cultivo de la almeja.

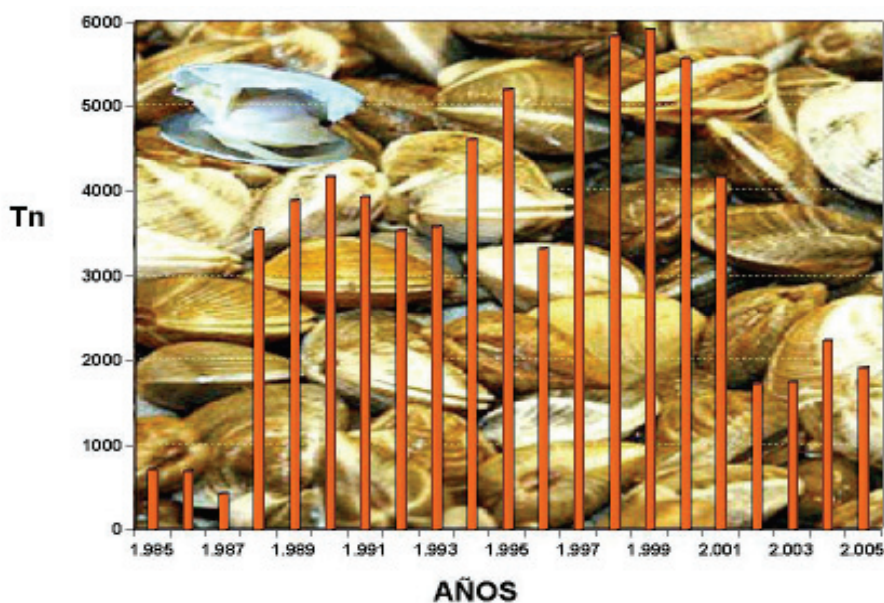
La mejor adaptación al medio estuarino disponible para las operaciones de engorde de bivalvos ha conducido al éxito del cultivo de especies como la ostra (*Ostrea edulis*) o la almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*). La almeja babosa (*Venerupis pullastra*) es

## Introducción

---

de rápido crecimiento, requiere lugares de cultivo protegidos de variaciones de salinidad y temperatura. Su comercialización está limitada por su baja resistencia a la desecación. La almeja fina (*R. decussatus*) necesita condiciones más estables que la japonesa, sus requerimientos de salinidad y temperatura son más limitados, aunque aguanta bien la desecación sobreviviendo mejor que la almeja babosa. La almeja japonesa tiene el mejor crecimiento pero su calidad es notablemente inferior. Estas tres especies de almeja son las más apreciadas en España y de mayor comercialización. La producción de almeja en España es casi totalmente artesanal.

En las figuras 1.3 y 1.4 se muestran respectivamente la producción nacional y de Galicia de los últimos 20 años. La alarmante disminución de la producción de almejas en los últimos años señala la necesidad de estudiar e intentar controlar las posibles causas, como la contaminación ambiental, el marisqueo incontrolado, el furtivismo, las condiciones ambientales adversas (lluvias), incendios o enfermedades. Es importante resaltar que en los cultivos de bivalvos, a diferencia de lo que ocurre con la acuicultura de peces, hay un gran desconocimiento de los problemas asociados a altas mortalidades.



**Figura 1.3.** Producción de almejas en España (1985-2005) (MAPYA).



**Figura 1.4.** Producción media de almeja en Galicia (Tn) (2001-2006) (JACUMAR).

#### **1.4. Microorganismos patógenos que afectan al cultivo de moluscos bivalvos.**

Durante mucho tiempo la semilla necesaria para el cultivo de moluscos bivalvos en Galicia procedía de la captación natural. Pero desde hace más de 20 años, debido a la sobreexplotación, los cultivos de almeja y ostra se enfrentan a una escasez de semilla autóctona de los bancos naturales. Este hecho propició la importación de semilla y ejemplares juveniles para una posterior fase de engorde en las costas gallegas, especialmente en las Rías Baixas donde las condiciones medioambientales son ideales para alcanzar el tamaño comercial en poco tiempo. La entrada masiva de moluscos de importación ha facilitado la introducción de nuevos agentes causantes de enfermedades en los cultivos de bivalvos en Galicia.

Hoy, los principales problemas en el cultivo de moluscos son las enfermedades, tanto en las fases larvares en criaderos como en la fase de engorde en el medio natural, que disminuyen gravemente la producción. Desde la década de los 60 se conoce que las enfermedades que afectan a larvas de bivalvos son en su mayoría de origen bacteriano, causadas principalmente por representantes del género *Vibrio* (Guillard 1959, Tubiash y col. 1965, Lodeiros y col. 1987). Con respecto a ejemplares adultos, en un principio se

prestó atención sólo a las patologías causadas por protozoos parásitos, como la bonamiasis en el caso de la ostra, la perkinsosis en la almeja y la marteiliosis en el mejillón y la ostra (Montes y col. 1991, Villalba y col. 1993b). Pero más tarde se descubrieron diferentes enfermedades de origen bacteriano como la enfermedad del anillo marrón en ejemplares adultos de almeja (Castro y col. 1992, Figueras y col. 1996). Hasta hoy, los estudios de patógenos virales en moluscos son más escasos a causa de la falta de líneas celulares apropiadas para lograr cultivar los virus en el laboratorio.

En los siguientes apartados se revisan los principales patógenos que afectan al cultivo de bivalvos, prestando más atención a las diferentes especies bacterianas que suponen un riesgo para las fases larvarias en criadero y para ejemplares juveniles y adultos cultivados en el medio natural.

### ***1.4.1. Parásitos.***

Las enfermedades parasitarias han sido probablemente el problema con más incidencia en el cultivo de bivalvos. Existen numerosos estudios que han abordado el tema, analizando aspectos como los factores que favorecen la parasitación, la evolución temporal o el cultivo *in vitro* y la detección de diferentes parásitos (Montes y col. 1991, Villalba y col. 1993a, b, 1995).

En el pasado se han registrado elevadas mortalidades de almeja fina, así como de otros moluscos, asociadas a la presencia de organismos tipo *Perkinsus* y *Haplosporidium* (Figueras y col. 1992).

Los protozoos del género *Perkinsus* son patógenos muy destructivos que han afectado al cultivo de bivalvos en todo el mundo (Bower y col. 1994, Villalba y col. 2004). *Perkinsus marinus* se identificó por primera vez como patógeno de ostra en el Golfo de Méjico en 1950. Originalmente se pensó que era un hongo, denominándose *Dermocystidium marinum* (Mackin y col. 1950). Desde su descubrimiento existe controversia sobre su posición taxonómica y filogenética. Algunos estudios han



sugerido que las especies de *Perkinsus* son o están cercanas a los dinoflagelados (Goggin y Baker 1993, Siddall y col. 1997, Murrell y col. 2002). Norén y col. (1999) sitúan el género *Perkinsus* en un nuevo filo, *Perkinsozoa*, dentro de los dinoflagelados junto con los filos *Dinoflagelata*, *Apicomplexa* y *Ciliophora*.

Se había considerado la existencia de 7 especies dentro del género, pero estudios moleculares más recientes han confirmado la existencia de 5 especies validadas con la presencia de dos sinónimos: *P. marinus*, *P. olsen*i (sinónimo de *P. atlanticus*), *P. mediterraneus*, *P. qugwadi* y *P. chesapeakei* (sinónimo de *P. andrewsi*) (Murrell y col. 2002, Villalba y col. 2004, Burreson y col. 2005). *Perkinsus olsen*i, originalmente descrita en oreja de mar (*Haliotis ruber*) en Australia (Lester y Davis 1981), es sinónimo de *P. atlanticus* que afecta a la almeja fina en la Península Ibérica (Azevedo 1989, de la Herrán y col. 2000, Montes y col. 2001, Casas y col. 2002, Villalba y col. 2005). *Perkinsus qugwadi* se detectó en la vieira *Patinopecten yessoensis* en Canadá (Blackbourn y col. 1998). *P. chesapeakei*, que se detectó por primera vez en la almeja *Mya arenaria* en la bahía de Chesapeake (McLaughlin y col. 2000), es sinónimo de *P. andrewsi* descrita en la almeja *Macoma balthica* en la bahía de Delaware (Coss y col. 2001). Y la especie más reciente es *P. mediterraneus* descrita en ostra plana en la Islas Baleares (Casas y col. 2004).

Hasta hoy las tres técnicas que se utilizan para diagnosticar la presencia de especies del género *Perkinsus* se basan en: (1) la morfología mediante la microscopía electrónica óptica y de transmisión; (2) la capacidad de crecimiento en medio tioglicolato y posterior tinción con Lugol; y (3) la secuenciación de la región espaciadora ITS (Intergenic transcribed spacer). La especie *P. qugwadi* es la única que no crece en el medio tioglicolato, siendo su morfología y secuencias de la región ITS muy diferentes con respecto al resto de las especies de *Perkinsus*. Por tanto se duda si el organismo pertenece o no al género (Coss y col. 2001, Casas y col. 2002). En un estudio reciente Abollo y col. (2006) diseñaron una metodología basada en la PCR y en la RFLP para un diagnóstico rápido y específico de las especies *P. olsen*i, *P. mediterraneus*, *P. marinus* y *P. chesapeakei*.

Organismos tipo *Perkinsus* se encuentran en tejidos de la glándula digestiva, branquias y pie. La presencia de *P. atlanticus* está asociada a reacciones inflamatorias con la formación de infiltraciones y granulocitomas. El parásito afecta tanto a la almeja japonesa como a la fina, con mayor prevalencia en la segunda especie (Figueras y col. 1996).

Casas y col. (2002) determinaron que la temperatura óptima de zooesporulación para *P. atlanticus* es de 19-28°C, y la salinidad óptima es de 25-35‰. También demostraron la efectividad del tratamiento con cloro a las concentraciones adecuadas dependiendo del momento del ciclo de vida del parásito. Villaba y col. (2005) observaron que la intensidad y prevalencia de la perkinsosis desciende en invierno y alcanza máximos valores dos veces al año, en primavera y a finales de verano-principios de otoño, asociándose con la temperatura del mar. Relacionaron la intensidad de infección del parásito con el tamaño de la almeja, no detectándose infección en almejas menores de 20 mm. Además, las mortalidades más altas coincidieron con los dos picos de infección. Estos autores han sugerido que los parásitos contribuyen pero pueden no ser la principal causa de la mortalidad de la almeja. En otros estudios, Figueras y col. (1996) y Montes y col. (2001) demostraron que la perkinsosis desestabiliza el metabolismo de la almeja utilizando sus reservas energéticas, y la hace más susceptible al desarrollo de infecciones bacterianas y virales oportunistas, y a cambios medioambientales como bajadas bruscas de salinidad.

Dos miembros del filo Haplosporidia, *Haplosporidium nelsoni* y *H. costale* han causado grandes mortalidades en el cultivo de la ostra americana, *Crassostrea virginica*, en la costa este de Norteamérica desde los años 1950 (Andrews 1966). *Haplosporidium nelsoni* se conoce comúnmente como MSX (esfera multinucleada X), y *H. costale* se suele denominar como SSO (sea side organism). La haplosporidiosis también se ha detectado en otras especies de ostra, entre ellas la ostra plana, *Ostrea edulis* (Azevedo y col. 1999) y en la ostra del Pacífico, *C. gigas*. Su distribución geográfica abarca

distintas partes del mundo: Corea, Taiwan, Japón, California y Francia (Burreson y col. 2000, Renault y col. 2000).

La infección por el parásito *Haplosporidium* se caracteriza por la presencia de plasmodios uni y multinucleares en branquias, gónadas y tejidos conectivos de la glándula digestiva (Renault y col. 2000). El diagnóstico de estos parásitos dependía de la histopatología, pero en muchos casos los plasmodios de *H. nelsoni* y *H. costale* no se diferenciaban bien mediante la microscopía, por lo que recientemente se han desarrollado técnicas moleculares como hibridaciones *in situ* y protocolos de PCR (Burreson y col. 2000, Penna y col. 2001).

Uno de los factores que más condicionan la presencia de *H. nelsoni* es la salinidad, ya que es incapaz de sobrevivir a salinidades inferiores a 10 ppm, y raramente a 15 ppm. No existe ningún tratamiento que se pueda aplicar para combatir la enfermedad. El cultivo de líneas de ostra resistentes al parásito parece ofrecer una posibilidad de control de la enfermedad.

Otro protozoo parásito que afecta al cultivo de la ostra es *Bonamia ostreae*, causante de la enfermedad de los hemocitos. Se describió por primera vez como el agente causal de altas mortalidades en la ostra plana en Francia en 1979 (Pichot y col. 1980). La enfermedad se propagó a los países cercanos como España, Holanda, Irlanda y el Sur del Reino Unido (Cochennec y col. 2000) Posteriormente se detectó en Estados Unidos (costas Este y Oeste) y en Australia. Su posición taxonómica es aún incierta. Brehelin y col. (1982) describieron un estadio de plasmodia similar a especies de *Haplosporidium*, pero la presencia de esporas no se ha detectado en infecciones de *Bonamia*, dificultando su clasificación.

*Bonamia ostreae* es un protozoo intrahemocítico, aunque puede ubicarse extracelularmente entre células epiteliales o intersticiales de las branquias y el tracto intestinal o en áreas del tejido conjuntivo necrotizado (Balouet y col. 1983). Microscópicamente se pueden observar lesiones en el tejido conectivo de branquias, manto y glándula digestiva con infiltración de hemocitos.

Como en los *Haplosporidium*, los métodos de diagnóstico basados en sus características morfológicas y estructurales mediante microscopía electrónica pueden crear confusión; hoy se recurre a métodos moleculares (Cochennec y col. 2000, Carnegie y col. 2003).

Dada la imposibilidad de realizar tratamiento terapéutico alguno en el medio marino, la puesta en práctica de medidas preventivas es necesaria para evitar la diseminación de la enfermedad y disminuir en lo posible sus consecuencias en zonas endémicas. Se ha observado una resistencia a la enfermedad en ostras por selección natural. La progenie de ostras que sobreviven a brotes previos de la enfermedad son más resistentes a *B. ostreae* (Martin y col. 1993, Culloty y col. 2004).

La Marteiliosis es una enfermedad de moluscos bivalvos causada por parásitos protistas del género *Marteilia* (Phylum *Paramixea*) (Berthe y col. 2000). El principal agente causal es *Marteilia refrigens*, incluida en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE, 2005).

En Europa, la especie *M. refrigens* ha causado graves mortalidades en ostra plana (Grizel y col. 1974), y *M. maurini* en mejillón (*Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis*) (Le Roux y col. 2001). *Marteilia refrigens* también se ha detectado en *Ensis minor* (Ceschia y col. 2001), *M. edulis* y *M. galloprovincialis* (Villalba y col. 1993b). Estudios recientes basados en datos moleculares sugieren la posibilidad de que las dos especies pertenezcan a la misma geno especie (Lopez-Flores y col. 2004, Novoa y col. 2005). La distribución geográfica del protista incluye: Francia, Grecia, Italia, Marruecos, Portugal y España (OIE, 2005). En España la marteiliosis se ha detectado en mejillones y en el solénido *Solen marginatus* en Galicia (Villalba y col. 1993b, López y Darriba 2006, López-Flores y col. 2008), así como en mejillones y ostras en el Delta del Ebro, lugar que se ha considerado como un modelo natural ideal para estudiar la dinámica y el ciclo de vida del parásito (Carrasco y col. 2008).

Otra especie dentro del género es *M. sydneyi* que es el agente etiológico de la enfermedad QX que afecta a la ostra *Saccostrea commercialis* en la costa este de Australia y en Nuevo Gales del Sur (OIE, 2005).

Las primeras etapas de la infección se sitúan en el epitelio del tracto digestivo del hospedador. La propagación del parásito en los divertículos digestivos implica un incremento exponencial del número de parásitos en el proceso de infección mediante la multiplicación “vegetativa” (merogonia) y esporulación. El protista se desarrolla principalmente en el epitelio del estómago y glándula digestiva agotando las reservas energéticas (glucógeno) de la ostra, interfiere de forma directa en la alimentación y absorción del hospedador, interrumpiendo su crecimiento y causando mortalidad. La infección provoca en el hospedador una reacción hemocítica que puede llegar a disminuir o interrumpir el proceso.

*Marteilia* se detecta durante todo el año con picos de infección entre mayo y junio (cuando la temperatura es  $>17^{\circ}\text{C}$ ), que se asocian con la esporulación del parásito (Carrasco y col. 2008). También se han detectado altos niveles de infección en febrero (Villalba y col. 1993b, Carrasco y col. 2008) cuando las temperaturas son mínimas. Los cambios bruscos de temperatura pueden actuar como choques térmicos que activan al parásito en el invierno (Carrasco y col. 2008).

La marteiliosis, también conocida como la enfermedad de Aber, es letal en ostras (Balouet 1979). En áreas enzoóticas se intenta el control acortando el tiempo de cultivo durante el periodo de transmisión de la enfermedad, con repoblaciones en baja densidad y cultivando en áreas con alta salinidad (35-37 ppm).

La histología es una técnica de rutina que se utiliza para la vigilancia de *M. refrigens*. Estudios recientes han caracterizado los genes 18S rRNA y los espacios intergénicos ITS-1 e IGS de *M. refrigens*, lo que ha permitido el desarrollo de protocolos de PCR e hibridación *in situ* para la detección del parásito (Kleeman y col. 2002, López-Flores y col. 2004, 2008). El gen 18S rRNA es altamente conservado y útil para comparar

secuencias de especies relativamente distantes en estudios de evolución. En cambio, los espacios intergénicos están sometidos a ninguna o a una presión selectiva menor, por lo que las secuencias nucleotídicas evolucionan rápido siendo, por tanto, marcadores útiles para identificación de especies cercanas. El uso de sondas en los análisis de hibridación *in situ* confirman las infecciones, mostrando la distribución y etapas de desarrollo de los parásitos presentes en las muestras que dieron positivas por ensayos de PCR (Kleeman y col. 2002)

Otro parásito que ha sido problemático en poblaciones de almejas cultivadas, *Mercenaria mercenaria*, es el Quahog Parasite Unknown (QPX). Se ha detectado en Canadá y en varias zonas de Massachussets, Nueva Jersey y Virginia (Whyte y col. 1994, Ragone-Calvo y col. 1998, Smolowitz y col. 1998). Es un parásito oportunista distribuido en ambientes costeros de salinidades altas afectando a ejemplares juveniles y adultos.

Otros parásitos también frecuentes en bivalvos incluyen los turbelarios de tipo *Urastoma*. *Urastoma cyprinae* se adhiere a las branquias de varias especies de bivalvos, incluyendo el mejillón (*M. galloprovincialis*) al que causa daños importantes (Robledo y col. 1994). Su presencia también se ha asociado a la ostra americana *C. virginica*, siendo capaz de producir cambios en la composición de enzimas proteolíticas del mucus del hospedador (Brun y col. 2000).

### **1.4.2. Virus.**

Como ya se ha comentado antes, el estudio de patógenos virales es limitado debido a la falta de líneas celulares para su cultivo. Una alternativa reside en la microscopía electrónica, aunque la sensibilidad de la técnica es muy baja en caso de infecciones leves, y por tanto su utilidad limitada en muchas ocasiones.

Hine y Wesney (1997) estudiaron los virus asociados a la citopatología en la glándula digestiva de un pectínido (*Pecten novaezelandiae*) en Nueva Zelanda. Encontraron un gran número de vesículas de membrana en la región central de la célula infectada, típico de los

mengovirus o poliovirus que pertenecen a la familia *Picornaviridae* (Amako y Dales 1967).

La neoplasia diseminada (ND) es una enfermedad viral de condición letal y progresiva en bivalvos. Se caracteriza por la presencia de células neoplásicas en el sistema circulatorio y espacios tisulares del organismo (Barber 2004). Esta enfermedad fue descrita por primera vez en ostras americanas (*C. virginica* y *C. gigas*) por Farley (1969). Desde entonces se ha descrito en, al menos, 20 especies de bivalvos incluyendo la ostra plana, mejillón (*M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. truncata*) y almeja (*Macoma* sp.). Recientemente se ha detectado en berberecho (*Cerastoderma edule*) en Galicia (Villalba y col. 2001, Carballal y col. 2003, Romalde y col. 2007).

Las alteraciones observadas en moluscos con ND son células extremadamente grandes con ratios núcleo/citoplasma altos, patrones de cromatina difusos y células pleomórficas (Villalba y col. 2001). Las mitocondrias aparecen inflamadas y los aparatos de Golgi alterados (Aufret y Poder, 1986). Los hemocitos neoplásicos son grandes, redondos con núcleos mayores que en células normales.

La etiología de la ND ha sido objeto de controversia durante muchos años, aunque existían evidencias de la implicación de un agente infeccioso. Así, se había demostrado su transmisión entre bivalvos de diferentes especies (Collins y Mulcahy 2003).

Posteriormente, se especuló con la asociación de la enfermedad con un retrovirus. Los retrovirus poseen un enzima característico esencial para su replicación, la reverso transcriptasa (RT), que transcribe el RNA genómico viral en una copia de DNA de doble hélice que se integra en el genoma del hospedador como un provirus. La actividad retrotranscriptasa se puede detectar fácilmente en ensayos *in vitro* (Pyra y col. 1994), que permitieron obtener nuevas evidencias de la etiología de la ND.

House y col. (1998) encontraron que tejidos procedentes de almeja (*Mya arenaria*) con alto nivel de ND resultaron positivos en el ensayo de la actividad RT, mientras que en

## ***Introducción***

---

almejas con bajo nivel de ND mostraron resultados negativos. Más tarde, Romalde y col. (2007) confirmaron la hipótesis de la etiología retroviral de la ND en berberechos de Galicia mediante microscopía electrónica de transmisión y cuantificación de la actividad RT.

Si bien la observación de partículas virales y la detección de actividad RT parecen pruebas evidentes de la implicación de un retrovirus en la enfermedad, el desarrollo de líneas celulares de invertebrados marinos podría permitir aislar y caracterizar el agente viral y así confirmar esta hipótesis.

Otro virus de importante incidencia en moluscos marinos es el Herpes virus de la Ostra. La detección del virus ha sido asociada a grandes mortalidades en larvas de moluscos bivalvos (Renault y Arzul 2001), como la ostra del Pacífico (Hine y col. 1992) y la ostra plana (Comps y Cochenec, 1993). La caracterización genómica y estructural de la nucleocápside confirma que el virus pertenece a la Familia *Herpesviridae* y es conocido como “Ostreid Herpesvirus” tipo I (OsHV-1). Los ejemplares adultos parecen ser más resistentes a infecciones del OsHV-1 que los juveniles. Se ha sugerido la posibilidad de una transmisión vertical. Arzul y col. (2002) detectaron el virus en células fibroblásticas de tejidos de gónada en ostra adulta (*C. gigas*) mediante hibridación *in situ* y métodos inmunoquímicos. La transmisión del virus de adultos portadores a su progenie sucedió durante el desove. Las células se liberaron con los gametos ocasionando una contaminación viral en larvas de ostra.

Además, se ha demostrado la transmisión entre diferentes especies de moluscos como *R. philippinarum* y *C. gigas* (Arzul y col. 2001). El virus también se ha detectado en gasterópodos como orejas de mar.

Los estudios histológicos no son siempre específicos para detectar este tipo de virus en moluscos enfermos, el desarrollo de técnicas moleculares incluyendo PCR e hibridación *in situ* (ISH) son importantes para mejorar el diagnóstico.



### **1.4.3. Bacterias.**

Uno de los problemas en el cultivo de moluscos bivalvos son los episodios sucesivos de mortalidad debido a patologías bacterianas. Algunas especies de los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas* que se han considerado microorganismos comensales en el tracto digestivo de bivalvos también han sido descritos como los principales agentes causantes de enfermedades afectando tanto a las fases larvarias, juveniles y adultos.

La patogenicidad de las bacterias en bivalvos no ha sido claramente establecida. El desarrollo de la enfermedad en muchas ocasiones se desencadena por un aumento de susceptibilidad a las infecciones debido a condiciones de estrés como variaciones de salinidad, contaminación de productos orgánicos, falta de alimento o presencia de otros microorganismos parásitos. Las bacterias oportunistas pueden ser tolerables en condiciones favorables pero en situaciones de estrés pueden causar enfermedades, principalmente en los estadios larvarios, por un aumento de la susceptibilidad del hospedador (Jeffries 1982, Elston 1984).

En este apartado se revisan los principales patógenos bacterianos que afectan a todas las etapas del cultivo de moluscos, centrándose más en las patologías asociadas a ejemplares adultos.

#### **1.4.3.1. Bacterias patógenas de larvas de bivalvos.**

La mayor parte de los estudios relacionados con enfermedades bacterianas de bivalvos se han centrado en la patología larvaria. Los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas* han sido descritos como los principales patógenos en larvas de bivalvos, en muchos casos actuando juntos en problemas de mortalidades (Guillard 1959, Tubiash y col. 1965, Di Salvo y col. 1978, Elston y Leibovitz 1980, Brown 1983, Garland y col. 1983, Elston 1984, Sugumar y col. 1998, Prado y col. 2005).

Las primeras investigaciones de enfermedades de origen bacteriano en larvas de bivalvos las realizaron Walne (1958) en larvas de ostra, y Guillard (1959) en larvas de *Mercenaria mercenaria*. Posteriormente Tubiash y col. (1965) describieron la “necrosis

bacilar” producida por especies del género *Vibrio* afectando a numerosos bivalvos: *C. virginica*, *O. edulis*, *M. mercenaria*, *Argopecten irradians* y *Teredo navalis*. Los signos de la necrosis bacilar son reducción en la movilidad, velo extendido y agrupamiento de bacterias en los bordes de las larvas (“swarming” bacteriano). Las larvas mueren por necrosis granular. Tubiash y col. (1965, 1974) confirmaron la resistencia de ejemplares adultos a los patógenos larvarios descritos. El término de necrosis bacilar se cita en muchos artículos posteriores para describir el efecto producido por miembros de los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas* (DiSalvo y col. 1978, Lodeiros y col. 1992, Luna-Gonzalez y col. 2002).

Con respecto a bacterias patógenas del género *Pseudomonas*, Brown (1974) describe una cepa de colonia roja que afecta a cultivos larvarios de *Mya mercenaria* y *C. virginica*, relacionando la virulencia con la pigmentación (Brown 1981). En trabajos posteriores Lodeiros y col. (1987) atribuyen la necrosis bacilar a dos cepas de *Pseudomonas* sp. y una de *Pseudomonas aeruginosa* en un criadero de *O. edulis* en Galicia. Más tarde, relacionaron una epizootia en larvas de viera *Euvola ziczac* con una especie del género *Pseudomonas* perteneciente al grupo alcaligenes, conjuntamente con bacterias del género *Vibrio* (Lodeiros y col. 1992). Otros trabajos han asociado bacterias del género *Pseudomonas* a larvas moribundas de otros bivalvos, como *Tridacna gigas* y *Argopecten purpuratus* (Sutton y Garrick 1993, Riquelme y col. 1995).

La necrosis bacilar se atribuyó principalmente a vibrios marinos (Tubiash y col. 1970), que posteriormente se identificaron como *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* y *V. tubiashii* (Hada y col. 1984). Brown y Losee (1978) registraron mortalidades en larvas de ostra (*C. virginica*) después de 6-8 días tras la inoculación de vibrios, observaron la necrosis bacilar, y concluyeron que la bacteria produce una toxina capaz de romper el tejido estructural de las larvas de ostra. DiSalvo y col. (1978) obtuvieron resultados similares con una cepa similar a *V. anguillarum* en *C. gigas* y *O. edulis*.

En 1980, Elston y Leibovitz describen tres tipos de patogénesis en larvas de *C. virginica* inoculadas con dos aislados de vibrios: 1) disrupción del manto, infección en la cavidad

visceral y alteración de funciones asociadas; 2) deformación del velo, pérdida de movilidad y problemas en el intercambio de metabolitos, con el consiguiente problema de escasez de nutrientes; y 3) progresiva atrofia visceral y lesiones en el tracto digestivo.

Estos trabajos han resultado ser la base para la descripción de un mayor número de patógenos bacterianos en larvas de bivalvos en estudios posteriores.

Aislados similares a las especies *V. splendidus* y *V. alginolyticus* se han descrito como patógenos en larvas de ostra (*C. gigas* y *O. edulis*)(Jeffries 1982) y de almeja (*Tridacna tropical* y *R. decussatus*)(Sutton y Garrick 1993, Gómez-León y col. 2005). La especie *V. splendidus* también se ha relacionado con mortalidades de *P. maximus* (Nicolas y col. 1996) y *C. virginica* (Sugumar y col. 1998); y *V. alginolyticus* con *A. purpuratus* (Riquelme y col. 1996), *A. ventricosus* (Sáinz y col. 1998), *Nodipecten subnodosus* y *Atrina maura* (Luna-Gonzalez y col. 2002). Sutton y Garrick (1993) también describieron aislados de características similares a *V. orientalis*, *V. campbellii*, *V. metschnikovii*, *V. harveyi* y *Photobacterium damsela* como patógenos, causando elevadas mortalidades.

Las especies de *Vibrios* descritas más recientemente como patógenas en larvas de bivalvos son *Vibrio pectenica*, *Vibrio neptunius* y *Vibrio ostreicida*. Nicolas y col. (1996) observaron que *V. pectenica* era mucho más patógena en cultivos larvarios del pectínido *P. maximus* que en *C. gigas*. Posteriormente la especie fue descrita por Lambert y col. (1998) y relacionaron su patogenicidad con su capacidad de inhibir específicamente los hemocitos del pectínido. La especie *V. neptunius* (Thompson y col. 2003d) fue aislada de diversos orígenes: de larvas de rodaballo (*S. maximus*), del cultivo de rotífero (*Brachionus plicatilis*) y de larvas del bivalvo *Nodipecten nodosus*. Su patogenicidad se demuestra en cultivos larvarios de bivalvos y se describe como un patógeno oportunista (Prado y col. 2005). La nueva especie *V. ostreicida* (Prado y col. 2008) se aisló en relación con episodios de mortalidad de semilla de la ostra plana. El desarrollo de la enfermedad es similar a la necrosis bacilar descrita con anterioridad.

Otros episodios de mortalidades larvarias se han asociado a cepas de otros géneros bacterianos: Garland y col. (1983) aislaron cepas del género *Alteromonas* en larvas de *C. gigas*, Sutton y Garrick (1993) describieron el género *Moraxella* en *T. gigas*, y Riquelme y col. (1996) considera *Aeromonas hydrophila* como una bacteria oportunista en larvas de *A. purpuratus*.

Los agentes responsables de las enfermedades larvarias parecen ser capaces de actuar conjuntamente, desarrollándose la infección como consecuencia del estrés en larvas. Por tanto, es importante obtener unas condiciones óptimas de calidad de agua y densidad de cultivo en un criadero. El uso de antibióticos en los cultivos puede ser recomendable, pero su uso sistemático puede dar lugar a la aparición de cepas resistentes. Es importante tener en cuenta que los géneros implicados (*Vibrio* y *Pseudomonas*) albergan plásmidos de tipo R, relacionados con la formación genética de resistencias a una amplia variedad de antibióticos.

Una solución para evitar las mortalidades en criaderos de moluscos reside en la identificación de características específicas en poblaciones diferentes y la selección genética de cepas resistentes a las especies bacterianas con mayor potencial patogénico. La producción de larvas resistentes a vibrios oportunistas podría significar la obtención de la cantidad y calidad de semilla necesaria para las posteriores etapas de engorde.

### 1.4.3.1. Enfermedades bacterianas de juveniles y adultos.

Los estudios de enfermedades bacterianas en moluscos bivalvos adultos son más escasos que los descritos en larvas. Al igual que en estadios larvarios, el género con más incidencia es *Vibrio*, coincidiendo incluso en algunos casos los agentes etiológicos, como las especies *V. tubiashii* y *V. alginolyticus*.

En los primeros estudios descritos sobre enfermedades en moluscos adultos, Tubiash y col. (1965) asociaron *V. tubiashii* y *V. alginolyticus* a numerosos bivalvos adultos moribundos (*M. mercenaria*, *C. virginica*, *M. edulis* y *Mya arenaria*). Posteriormente

Elston y col. (1982) describieron una infección en *O. edulis* y *C. virginica* con anomalías en la concha, alteraciones en la función del ligamento y en los procesos de digestión. Identificaron los agentes causales como *Vibrio* spp. También estudiaron la patogénesis de la vibriosis en orejas juveniles (*Haliotis rufescens*) (Elston y Lockwood 1983).

En los años 90 se asociaron especies del género *Vibrio* a brotes epizooticos en la almeja fina en Galicia y Málaga (Castro y col. 1990, Hazañas y col. 1990). La especie predominantemente asilada en ejemplares moribundos fue identificada como *V. alginolyticus*.

Hasta hoy las enfermedades bacterianas descritas en bivalvos adultos incluyen: las producidas por bacterias Gram negativas como la “mortalidad de verano”, la enfermedad del anillo marrón (BRD, Brown Ring Disease) y la enfermedad de la ostra juvenil (JOD, Juvenile Oyster Disease); por bacterias Gram positivas como la Nocardiosis (PON, Pacific Oyster Nocardiosis); por procariotas intracelulares similares a *Rickettsia*; y las producidas por otros organismos de etiología bacteriana como *Chlamydia* y *Citophaga*.

### Mortalidad de verano.

La enfermedad denominada “mortalidad de verano” consiste en episodios de mortalidad en ostras (*C. gigas*) juveniles (5 a 40 mm) que suceden en los meses cálidos (a una temperatura del agua >18°C). Las pérdidas pueden llegar a ser del 80% de la producción causando graves problemas económicos para los productores. Los episodios se han descrito principalmente en Francia.

Lipp y col. (1976) establecieron la primera evidencia de la asociación de la mortalidad de verano con un agente infeccioso. Aislaron vibrios a partir de la hemolinfa de ostras moribundas y observaron mortalidades en infecciones experimentales a temperaturas elevadas. En un estudio más reciente Lacoste y col. (2001a) atribuyeron la causa de la mortalidad de verano en Francia a una infección causada por *V. splendidus*.

## Introducción

---

Posteriormente Waechter y col. (2002) aislaron la especie *V. chagasii* (anteriormente clasificada como *V. splendidus* II) en un episodio de mortalidad, reproduciendo la enfermedad en el laboratorio.

Gay y col. (2004a) determinaron que cepas del grupo polifilético de *V. splendidus* estaban relacionadas con la patogenicidad en las ostras durante estos eventos de mortalidad. También demostraron la virulencia de algunas cepas para almeja japonesa. Realizaron infecciones experimentales y observaron lesiones en el músculo aductor (Gay y col. 2004b). Estos estudios parecen indicar que distintas especies dentro de este grupo bacteriano están involucradas en la “mortalidades de verano” (Le Roux y col. 2002), aunque no hay suficientes datos para confirmar cual(es) de ellas son el agente causal.

Garnier y col. (2007) analizaron las poblaciones bacterianas asociadas a mortalidades de verano en *C. gigas* y observaron una carga bacteriana mayor en la hemolinfa de ostras enfermas que de las sanas. Un análisis filogenético basado en el gen *gyrB* identificó las bacterias asociadas. *V. aestuarianus* fue la especie aislada más frecuentemente (56%) junto con cepas tipo *V. splendidus* (25%), *Pseudoalteromonas* sp. (12%) y las especies *V. natriegens* y *V. parahemolyticus* (6%). Mediante análisis histológicos observaron necrosis en el músculo aductor y en tejidos conectivos, y atrofia en los divertículos digestivos de algunos ejemplares. Las bacterias no parecían agruparse en colonias, sino estar dispersas en tejidos distintos.

Otro estudio que ha demostrado la virulencia de la especie *V. aestuarianus* es el realizado por Laubreche y col. (2006b), en el que se indujo la inhibición de las funciones de los hemocitos de ostra mediante la inoculación de productos extracelulares bacterianos.

La “mortalidad de verano” no se puede atribuir a un solo patógeno bacteriano, es una interacción compleja de tres elementos: microorganismos patógenos, factores ambientales y estado fisiológico del hospedador. La multiplicación de bacterias y las

mortalidades de moluscos están asociadas con la subida de temperatura. La infección por bacterias oportunistas puede estar ligada a la debilidad de los mecanismos de defensa del bivalvo durante su etapa de maduración y/o a un incremento de la población bacteriana en el medio marino. También es importante considerar que el impacto real puede ser debido a un efecto acumulativo de una mezcla de bacterias infectivas. Futuros estudios que realicen co-infecciones de varias bacterias patógenas permitirán esclarecer si actúan conjuntamente para inducir la enfermedad.

### Enfermedad del anillo marrón.

La enfermedad del anillo marrón (BRD, “Brown Ring Disease”) ha constituido uno de los principales factores limitantes del cultivo de la almeja japonesa en muchas costas europeas, siendo la única patología de demostrada etiología bacteriana que afecta a almejas adultas. Se detectó por primera vez en el año 1987 en almejas cultivadas en Finisterre, Francia (Paillard y Maes 1989). Su agente causal es una especie dentro del género *Vibrio*, denominada *Vibrio tapetis*, que altera el proceso de calcificación y provoca un depósito orgánico de color marrón en la superficie interna de las valvas, localizado específicamente entre la línea paleal y el margen de la concha (Paillard y col. 1994, Borrego y col. 1996). Los principales signos que caracterizan la enfermedad fueron descritos por Paillard y col. (1989). Consisten, además del depósito en las valvas, en una reducción en la tasa de crecimiento y deformaciones de la concha. En un estado avanzado de la enfermedad se producen alteraciones en la glándula digestiva y en el manto (Plana y Le Pennec 1991).

BRD se ha detectado en poblaciones naturales y cultivadas de almeja en Francia, Inglaterra, Irlanda, España e Italia (Paillard y col. 1994). Se han detectado signos de BRD en un amplio rango de hospedadores: otras especies de almeja (*R. decussatus*, *Tapes rhomboides*, *Venerupis aurea* y *Dosinia exoleta*), en otros bivalvos (*P. maximus*, *Chlamys varia*) (Maes y Paillard 1992), y en gasterópodos como la oreja de mar (*Haliotis rubra*) (Marshall y Day 2001). El impacto en *R. decussatus* es menor que en *R. philippinarum*. Bajo condiciones similares, la prevalencia de BRD en *R. decussatus* es del 20-40% frente al 40-100% en *R. philippinarum* (Allam y col. 2001).

La enfermedad causa mortalidades masivas en individuos juveniles y adultos de almeja japonesa, especialmente en invierno y primavera debido a que la temperatura óptima de crecimiento de *V. tapetis* es de 15°C. La bacteria no crece a temperaturas superiores de 27°C. Se han identificado factores de virulencia como propiedades de adherencia (pili) y toxinas como las hemolisinas y citotoxinas (Borrego y col. 1996). Allam y Ford (2006) demostraron que productos extracelulares de *V. tapetis* alteran los hemocitos de *R. philippinarum* disminuyendo su viabilidad y actividad fagocítica. También demostraron que *V. tapetis* afectaba más a los hemocitos de *R. philippinarum* que de *M. mercenaria* o *C. gigas*.

Respecto a los métodos de diagnóstico, Paillard y Maes (1994) establecieron un sistema de clasificación basado en observaciones macroscópicas de los signos y lesiones de la enfermedad. Castro y col. (1995) desarrollaron técnicas inmunológicas para la identificación de *V. tapetis*, y Paillard y Maes (1995) observaron alteraciones en la lámina periostracal mediante microscopía electrónica. El problema de estos métodos es que en muchos casos no poseen la suficiente sensibilidad para detectar el patógeno en muestras poco infectadas, lo que limita la aplicación de medidas preventivas que impidan la transmisión de la enfermedad. Se han descrito protocolos de PCR para la detección de *V. tapetis* siendo sensibles y específicos (Paillard y col. 2006, Romalde y col. 2007). La variabilidad intraespecífica de cepas de distintos orígenes de *V. tapetis* se ha demostrado mediante técnicas moleculares (Rodríguez y col. 2006, Romalde 2005, Romalde y col. 2002), lo que ha supuesto un avance en estudios epidemiológicos.

Noel y col. (1992) y Martínez-Manzanares y col. (1998) propusieron tratamientos contra BRD, si bien la aplicabilidad de estos en los cultivos semi-intensivos puede ser difícil. Una solución reside en el potencial de la ingeniería genética para la obtención de familias de bivalvos resistentes a la enfermedad del anillo marrón.



### Enfermedad de la Ostra Juvenil.

La enfermedad de la ostra juvenil (JOD, “Juvenile Oyster Disease”) se caracteriza por el ahuecamiento de la valva inferior y el depósito de conchiolina en la superficie interna de las valvas alrededor de la periferia del manto. Otros signos observados incluyen bordes irregulares de las valvas, retracción del manto, tejidos licuados y cese de crecimiento (Bricelj y col. 1992, Ford y Borrego 2001). El estudio de cortes histológicos ha permitido observar lesiones en el epitelio del manto en zonas adyacentes a la formación de conchiolina (Ford y Borrego 2001).

Como su nombre indica, las ostras juveniles (<25 mm) son más vulnerables a la enfermedad que las adultas, que pueden llegar a sobrevivir durante más tiempo (Davis y Barber 1994). Más específicamente, las ostras más pequeñas (<15 mm) normalmente mueren sin evidencias de depósitos de conchiolina. Por el contrario, las ostras más grandes producen el depósito pero sin efectos devastadores en el crecimiento ni alteraciones en los tejidos (Maloy y col. 2007).

La enfermedad aparece cuando la temperatura del agua alcanza 25°C. Ha causado mortalidades del 90% en zonas al nordeste de Estados Unidos (Bricelj y col. 1992), y también se ha detectado en ostras cultivadas en Francia (Renault y col. 2002).

La etiología de la JOD fue difícil de demostrar. Los estudios de Boettcher y col. (1999, 2000) revelaron que las ostras enfermas estaban colonizadas por una  $\alpha$ -proteobacteria del clado *Roseobacter*, que posteriormente se describió como *Roseovarius crassostreae* (Boettcher y col. 2005). Tras la caracterización del patógeno, Maloy y col. (2007) propusieron el nuevo nombre de “Roseovarious oyster disease” (ROD) para denominar a la enfermedad.

Boardman y col. (2008) determinaron que la colonización de *R. crassostreae* en la cara interna de las valvas es una característica clave en la patogenicidad de la enfermedad, y que las fimbrias polares de la bacteria son importantes en el proceso. Los factores de

## ***Introducción***

---

adherencia y la habilidad para crecer en la biopelícula de conchiolina podrían explicar la protección y evasión de los mecanismos de defensa del hospedador.

En otro estudio Gómez-León y col. (2008) inocularon la bacteria *R. crassostreae* por baño en larvas y ostras juveniles y adultas. Obtuvieron mortalidades en larvas y ostras juveniles, con la presencia de signos característicos de la enfermedad en ejemplares entre 15 y 22 mm. También observaron que la resistencia de la ostra incrementaba con el tamaño. Mediante experimentos *in vitro* demostraron que los productos extracelulares (ECP) de *R. crassostreae* poseen actividad citotóxica y disminuyen los hemocitos de las ostras. Propusieron la teoría de que las barreras externas y las mucosas contribuían a la resistencia de la enfermedad bacteriana que se observaba en los individuos más adultos.

Una posible estrategia para prevenir la enfermedad de ROD es la detección precoz de *R. crassostreae*, como por ejemplo mediante el protocolo de PCR descrito por Maloy y col. (2005). Como ya se ha comentado, el desarrollo de líneas resistentes a la enfermedad sería la medida más efectiva.

## **Nocardiosis**

El género *Nocardia* engloba varias especies que causan enfermedades clínicas en animales, incluyendo el hombre. En 1991 una bacteria perteneciente a este género se asoció a mortalidades de la ostra del Pacífico en la Columbia Británica (Canadá) y en el estado de Washington (Friedman y Hedrick 1991, Friedman y col. 1991). Las ostras infectadas presentaban zonas de decoloración en el manto con nódulos verdosos o amarillentos en el músculo aductor, branquias, corazón y manto. Los nódulos se componían de hemocitos del hospedador alrededor de bacterias filamentosas Gram positivas. El agente se identificó como un miembro del género *Nocardia* en base a estas características. La enfermedad se nombró como la Nocardiosis de la ostra del Pacífico (PON, Pacific Oyster Nocardiosis). La caracterización de las cepas aisladas demostró que se trataba de una nueva especie dentro del género, descrita por Friedman y col. (1998) con el nombre de *Nocardia crassostreae*.

Las infecciones se detectan todo el año, pero las mortalidades ocurren en verano y otoño. Se ha estimado que en algunos sitios pueden producir hasta el 35% de mortalidad (Bower y col. 1994). Su distribución geográfica abarca la costa oeste de Norteamérica, desde la Columbia Británica a California, el estado de Georgia (USA), y Japón (bahía de Matsushima).

Las técnicas de diagnóstico se basan en la observación macroscópica de los signos, histología y el uso sondas de DNA (Gee y Elston 1997). Su erradicación no es posible, algunas estrategias descritas son los sistemas de cultivo sin estar en contacto con el fondo y evitar áreas cálidas poco profundas durante los meses de verano (Bower y col. 1994).

### Procariotas tipo *Rickettsia*.

Las Rickettsias son bacterias Gram negativas, patógenos intracelulares que se dividen sólo en las células del hospedador. Los organismos tipo *Rickettsia* (RLOs, “*Rickettsia*-like organisms”) se han descrito en una amplia variedad de animales acuáticos, tanto en peces, como en moluscos y crustáceos. Desde la primera descripción de estos organismos en bivalvos (Harshbarger y col. 1977) se han detectado en numerosas especies de vieira (Gulka 1983, Le Gall y Mialhe 1992), almeja (Villalba y col. 1999) y ostra (Sun y Wu 2004). En algunos casos se han asociado a enfermedades y mortalidades, como en la almeja (*Venerupis rhomboides*) en Galicia (Villalba y col. 1999) o en la ostra perlífera (*Pinctada maxima*) y la ostra australiana (*Crassostrea ariakensis*) en China (Wu y Pan 1999, Sun y Wu 2004).

Algunas características son comunes en las rickettsias descritas: 1) son parásitos obligados en las células del hospedador formando inclusiones citoplasmáticas (que se observan por histología); 2) su forma es pleomórfica; 3) son Gram negativas y rojas con la tinción de Giemsa; 4) la estructura es bacteriana, presentando una pared celular de Gram negativas con membrana externa, una zona periplásmica ribosomal densa en electrones, una estructura nucleoide, y un modo de multiplicación mediante fisión

binaria; y 5) las células del hospedador contienen vacuolas fagocíticas limitadas por membranas asociadas a estos organismos (Sun y Wu 2004).

Wu y Pan (1999) observaron dos tipos celulares en algunas infecciones por estos organismos, una variante pequeña y una variante grande, que presentan dos métodos de multiplicación distintos, mediante fisión binaria y gemación respectivamente.

Los RLO forman microcolonias en las células epiteliales del manto, glándula digestiva, branquias y hepatopáncreas; y en el tejido conectivo del manto y hepatopáncreas (Gulka y col. 1983, Wu y Pan 1999). La patogenicidad de estos microorganismos no está clara. Unos autores sugieren que los RLO son directamente responsables de causar la enfermedad y mortalidad en moluscos marinos (Gulka y col. 1983, Norton y col. 1993, Wu y Pan 1999, 2000). Otros en cambio sugieren que no causan daño patológico al hospedador en casos de infección ligera (Fries y Grant 1991). Las Rickettsias no matan las células del hospedador mediante la producción de toxinas sino mediante la destrucción celular (Romero y col. 2000).

Las técnicas de diagnóstico se basan en la histología, microscopía electrónica, técnicas inmunológicas, purificación y caracterización bioquímica y sondas de DNA.

### Otras enfermedades de etiología bacteriana: *Chlamydia* y *Cytophaga*.

El género *Chlamydia* se ha descrito en muchos trabajos junto con las rickettsias debido al parecido en su estructura morfológica, si bien las rickettsias presentan una pared celular con membrana externa y pueden crecer en fagolisosomas, a diferencia de las clamidias que carecen de estas características.

Se han descrito infecciones de clamidias en numerosas especies de bivalvos que incluyen ostra, viera, almeja y mejillón (Harshberg y Chang 1977, Morrison y Shum 1982, Cajaraville y Angulo 1991, Svärd 1999, Hine y Diggles 2002). Como sucede en los organismos de origen rickettsiano las descripciones son mediante estudios histológicos, y su potencial patogénico se ha relacionado con la intensidad de infección (Svärd 1999, Ward y col. 2004).

El género *Cytophaga* se ha descrito como el agente causante de lesiones observadas en el ligamento de ostras juveniles (Dungan y col. 1989). El ligamento es responsable de la apertura de las valvas, por tanto es de gran importancia en las funciones fisiológicas y de defensa del hospedador, que son esenciales para el crecimiento y supervivencia. Las lesiones causadas por representantes del género *Cytophaga* suponen un debilitamiento fisiológico además de un fácil acceso de patógenos y sustancias tóxicas a la cavidad paleal del bivalvo, debido a la pérdida de la barrera mecánica. La proliferación bacteriana y licuación del ligamento se incrementa cuando la temperatura del agua está entre 10 y 20°C (Dungan y col. 1989).

La bacteria se cultiva en medios con bajas concentraciones de nutrientes, reconociéndose por los márgenes rizoides de sus colonias y por su habilidad para desplazarse mediante un movimiento deslizante sin presencia de flagelo. Las células bacilos filamentosos con longitudes muy variables.

Se considera que las lesiones en el ligamento disminuyen la resistencia de las ostras a la infección por otros microorganismos patógenos.

## **II. OBJETIVOS**

## **II. OBJECTIVES**

## **2. OBJETIVOS.**

El objetivo general del presente trabajo es avanzar en el conocimiento de la microbiota asociada a poblaciones de almejas cultivadas, con el fin de obtener una mejor comprensión de las relaciones bacteria-hospedador y detectar posibles causas que limiten el cultivo de este molusco bivalvo. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Análisis de la diversidad bacteriana del género *Vibrio* en almejas cultivadas mediante identificación bioquímica.
2. Estudio de la diversidad genómica y caracterización genética de aislados bacterianos del género *Vibrio*.
3. Análisis polifásico de los grupos de vibrios no identificados a nivel de especie, para determinar sus posiciones taxonómicas. Caracterización de tres nuevas especies de *Vibrionaceae*.
4. Estudio de los factores de virulencia de especies de la familia *Vibrionaceae*. Demostración de su potencial patogénico para los estadios larvario y adulto de almeja.

## **2. OBJECTIVES**

The overall objective of the present study is to gain further knowledge in the microbiota associated with cultivated clam populations, in order to obtain a better understanding of the bacteria-host relationships and be able to detect possible causes that limit the cultivation of this bivalve mollusc. The following specific objectives were performed:

1. Analysis of the *Vibrio* diversity in cultured clams by phenotypic characterization.
2. Study of the genomic diversity and genetic characterization of *Vibrio* isolates.
3. Poliphasic analysis of the *Vibrio* groups unidentified to the species level, to determine their taxonomic positions. Characterization of three new species in the Family Vibrionaceae.
4. Study of the virulence factors of species within the family Vibrionaceae. Demonstration of their pathogenic potential for the larval and adult stages of clam.



### **III. BACTERIAS ASOCIADAS AL CULTIVO DE LA ALMEJA**

### 3. BACTERIAS ASOCIADAS AL CULTIVO DE LA ALMEJA.

#### 3.1. INTRODUCCIÓN

##### 3.1.1. *Microbiota bacteriana asociada a bivalvos.*

La mayoría de los estudios que han descrito las poblaciones bacterianas en agua de mar, sedimentos y organismos marinos se han centrado en grandes grupos taxonómicos (Lovelace y col. 1968, Kueh y Chan 1985) o en la detección, localización y aislamiento de especies patógenas (Wright y col. 1996, Arias y col. 1999, Gay y col. 2004a, Gómez-León y col. 2005, Boardman y col. 2008). Hasta hoy son pocos los trabajos que hayan estudiado la diversidad, distribución y densidades de bacterias asociadas a moluscos bivalvos. Entre los más antiguos cabe destacar el estudio realizado por Colwell y Liston (1961) en el que analizan la microbiota bacteriana en ostras del Pacífico (*C. gigas*) de varias zonas geográficas de Washington. Encontraron una elevada proporción de bacterias Gram negativas ( $\approx 80\%$ ), predominando los géneros *Pseudomonas* y *Vibrio* que constituyeron el 50%, aunque también aislaron bacterias de los géneros *Flavobacterium* y *Achromobacter*. Determinaron que la microbiota comensal de la ostra está compuesta por típicas bacterias psicrófilas marinas que están fisiológicamente adaptadas para residir en el micro-ambiente del bivalvo. Otros estudios realizados durante esos años obtuvieron resultados parecidos (Colwell y Sparks 1967, Lovelace y col. 1968).

Los organismos marinos tienen dos tipos de poblaciones bacterianas: la residente, que mantiene su presencia estable en el hospedador sin estar influenciada por el medio marino, y la de transición, que varía según las condiciones ambientales del medio. Jorquera y col. (2001) consideraron que las bacterias presentes en bivalvos son poblaciones de transición. Se han asignado una amplia variedad de funciones a estas comunidades bacterianas: como fuente de alimentación o vitaminas, factores de crecimiento para larvas, ayuda en los mecanismos de defensa para prevenir la colonización por otros patógenos bacterianos y eliminación de sustancias tóxicas (McHenery y Birkbeck 1985, Prieur y col. 1990, Segueineau y col. 1996). Riquelme y col. (1997) determinaron que las larvas de la vieira *Argopecten purpuratus* sobrevivían

y crecían mejor en presencia de bacterias, confirmando su papel de alguna manera beneficiosa.

Rajagopalan y Sivalingham (1978) estudiaron las comunidades bacterianas del mejillón *Mytilus viridis* y de la ostra *Crassostrea cuculata*. Obtuvieron tanto especies Gram negativas (*Pseudomonas*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Escherichia* y *Neisseria*) como Gram positivas (*Corynebacterium*, *Streptococcus* y *Micrococcus*), siendo los recuentos bacterianos mayores en el tracto digestivo que en el resto de los órganos. Estudios posteriores determinaron que la mayor acumulación de bacterias en bivalvos ocurre en el tracto digestivo debido a un lento tránsito intestinal que permite a las bacterias sobrevivir y crecer (Garland y col. 1982). Ward y col. (1997) sugirieron que la selección de microalgas utilizadas como alimento afecta la composición de la microbiota del bivalvo.

Pocos estudios han comparado la composición general entre la microbiota bacteriana en moluscos bivalvos y en su ambiente marino, debido a la necesidad de métodos tediosos para las caracterizaciones fenotípicas de muchas cepas, que normalmente requieren un análisis taxonómico numérico. La mayoría de los análisis realizados han demostrado que hay un mayor número de bacterias heterotróficas en muestras de bivalvos que en medio marino, pero los resultados varían con respecto a la composición de especies bacterianas.

Murchelano y Brown (1970) analizaron la microbiota bacteriana presente en la columna de agua en contacto con ostras americanas (*C. virginica*) y encontraron que el 97.8% eran bacterias Gram negativas. Aislaron representantes de los géneros *Pseudomonas* (40.6%), *Vibrio* (4.9%), *Achromobacter* (28.6%), *Flavobacterium* (23.1%), *Cytophaga* (0.4%), *Micrococcus* (0.3%) y *Bacillus* (0.1%). Según estos resultados, en el agua de mar había un menor porcentaje de bacterias del género *Vibrio*, pero mayor del género *Pseudomonas* en comparación con el interior de las ostras.

Prieur y col. (1990) analizaron la microbiota de diversos bivalvos en un criadero experimental. Aislaron bacterias fermentativas Gram negativas que correspondían a los géneros *Photobacterium* y *Vibrio*. También demostraron la relación entre la microbiota asociada a los moluscos y su ambiente marino, confirmando que los vibrios siempre eran más abundantes en los bivalvos que en agua de mar o en los sedimentos. Sugita y col. (1981) estudiaron las poblaciones bacterianas de seis especies de bivalvos, *R. philippinarum*, *Macraa veneriformis*, *Mytilus coruscus*, *C. gigas*, *Phacosoma japonicum* y *Scapharca broughtonii*, así como el agua y sedimento de la bahía de Tokio. En general las bacterias dominantes fueron anaerobias facultativas, mayoritariamente de los géneros *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Moraxella* y *Micrococcus*, encontrándose la misma composición en menores cantidades en el sedimento y en el agua de mar. Concluyeron que la microbiota de los bivalvos está influenciada por las condiciones ambientales que regulan la microbiota de su hábitat. Kueh y Chan (1985) también encontraron diferencias en número y composición de bacterias entre los moluscos y el agua de mar. Los bivalvos *C. gigas*, *Perna viridis* y *Scapharca cornea* contenían altas cantidades de bacterias heterotróficas, principalmente *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Acinetobacter* y *Aeromonas*; mientras que en el agua aparecían principalmente bacterias coliformes y corineformes.

Otros trabajos han examinado la fluctuación estacional de bacterias en bivalvos. En el estudio de Brown y col. (1988) las especies de *Achromobacter* tuvieron su pico de abundancia en los meses de invierno; por el contrario, las especies de *Pseudomonas* no mostraron una variación estacional. Los géneros *Flavobacterium* y *Vibrio* fueron más abundantes en verano por su asociación con el fitoplancton, cuyas concentraciones se incrementan con la subida de temperatura coincidiendo con la proliferación de vibrios en el ambiente marino (Farmer 1992).

Los resultados del trabajo realizado por Pujalte y col. (1999) con ostra (*O. edulis*) del Mediterráneo determinaron que durante los meses más cálidos el grupo más abundante en el agua de mar eran las bacterias anaerobias halófilas *Vibrionaceae*, así como *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* y *Shewanella*, mientras que en la temporada más fría

dominaban las bacterias oxidativas ( $\alpha$ -Proteobacterias). En muestras de ostra, las bacterias dominantes a lo largo de todo el año fueron los vibrios (65%). Los más abundantes fueron *V. splendidus* (40%) y *V. harveyi* (14%). Ambas especies comparten algunas características (rango de salinidad, producción de alginasa) pero su comportamiento dominante sobre otras bacterias es opuesto debido a sus preferencias de temperatura. Las especies *V. harveyi*, *V. pelagius*, *V. mediterranei* y *V. tubiashii* aparecían en los meses cálidos; mientras que *V. splendidus* dominaba la comunidad bacteriana durante el invierno y la primavera. La época del año no pareció afectar a especies aerobias, se encontraron también  $\alpha$ -Proteobacterias y  $\gamma$ -Proteobacterias pero ninguna *Cytophaga-Flavobacterium*. En este estudio las muestras de agua fueron mucho más ricas en especies que las muestras de ostra y no se observó una dominancia de ninguna especie ni relación con las estaciones. En las muestras de agua se aislaron bacterias de los géneros *Vibrio*, *Photobacterium*, *Halomonas*, *Oceanospirillum*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas* y *Shewanella* entre otros. El 60% de los aislados no pudieron ser identificados y pertenecían principalmente a las  $\alpha$ -Proteobacterias,  $\gamma$ -Proteobacterias y *Cytophaga-Flavobacterium*.

Ortigosa y col. (1994) obtuvieron una composición similar en el agua de mar en su estudio con ostra plana en Valencia, e identificaron especies de los géneros *Alteromonas*, *Shewanella*, *Deleya*, *Flavobacterium*, *Oceanospirillum*, *Pseudomonas* y aislados tipo *Agrobacterium*.

Como se explica en el Capítulo 1 de esta Memoria los vibrios son probablemente el género bacteriano con mayor potencial patogénico para bivalvos conocido hasta la fecha, siendo la temperatura un factor abiótico clave que puede afectar su grado de patogenicidad. Los vibrios también están asociados a la fijación del nitrógeno, la degradación de productos orgánicos, y la colonización de superficies y órganos internos de vertebrados e invertebrados marinos. Si los moluscos bivalvos se encuentran bajo condiciones de estrés, algunas de las especies que mantienen una relación de comensalismo pueden actuar como patógenas.

Los estudios realizados en la identificación de especies de vibrio a partir de moluscos coinciden en algunas especies dominantes con ligeras diferencias en la composición total. Muchos describen la variación estacional de *V. harveyi* y *V. splendidus* (Arias y col. 1999, Lida y col. 2000, Ortigosa y col. 1989, Maugeri y col. 2000). Lida y col. (2000) observaron un cambio de composición a nivel de especie con el cambio estacional pero no a nivel de género. Montilla y col. (1994) encontraron que los vibrios más frecuentes asociados a ostras, mejillones y almejas del Delta del Ebro fueron *V. fluvialis*, *V. pelagius*, *V. tubiashii*, *V. splendidus*, *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*. En el estudio de Hariharan y col. (1995) los vibrios identificados en ostras y almejas de Canadá fueron *V. anguillarum*, *V. alginolyticus* y *V. splendidus*. Maugeri y col. (2000) estudiaron los mejillones en aguas salobres de Italia e identificaron las especies *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. mimicus*. Los estudios de Pujalte y col. (1999) y Macián y col. (2000a) en la costa mediterránea mostraron una incidencia muy baja del patógeno *V. vulnificus* debido a que las altas salinidades en el mar Mediterráneo favorecen el crecimiento de otras especies de *Vibrio*.

Posteriormente, el estudio de Castro y col. (2002) sobre la diversidad de vibrios en almeja japonesa coincide con los trabajos sobre ostra y mejillón. Las especies que predominaron fueron *V. splendidus*, *V. harveyi* y *V. tubiashii*, y en menor cantidad *V. mediterranei*, *V. alginolyticus* y *Aliivibrio logei*.

La especie *V. tubiashii* aparece como dominante en los resultados de Castro y col. (2002) en Andalucía y de Montilla y col. (1994) en el Delta del Ebro; pero en menor proporción en los estudios de Pujalte y col. (1999) y Arias y col. (1999) en Valencia.

Guisande y col. (2004) demostraron que existe una dominancia de vibrios asociados a almejas y ostras, mientras que los géneros aerobios *Shewanella*, *Pseudoalteromonas* y *Pseudomonas* se asocian a muestras de fitoplancton. Las especies de vibrio identificadas mediante taxonomía numérica fueron *V. aestuarianus*, *V. splendidus* I, *V. alginolyticus*, *V. mytili*, *V. anguillarum*, *V. furnissii*, *V. orientalis* y *Aliivibrio salmonicida*. En un estudio más reciente Farto y col. (2006) identificaron una gran variedad de bacterias

aerobias asociadas al cultivo de la ostra en Galicia mediante pruebas bioquímicas y secuenciación del gen 16S rRNA.

Estos datos resaltan la diversidad de bacterias marinas asociadas a los bivalvos cultivados. El género *Vibrio* es hoy el más conocido aunque todavía hay muchas especies que no se han identificado. Por el contrario existe muy poca información sobre las bacterias aerobias Gram negativas, fenotípicamente muy variables y poco reactivas, lo que dificulta su identificación por métodos bioquímicos. Futuros estudios que profundicen en estos aspectos son importantes para obtener mayor información y así entender mejor las relaciones bacteria-hospedador.

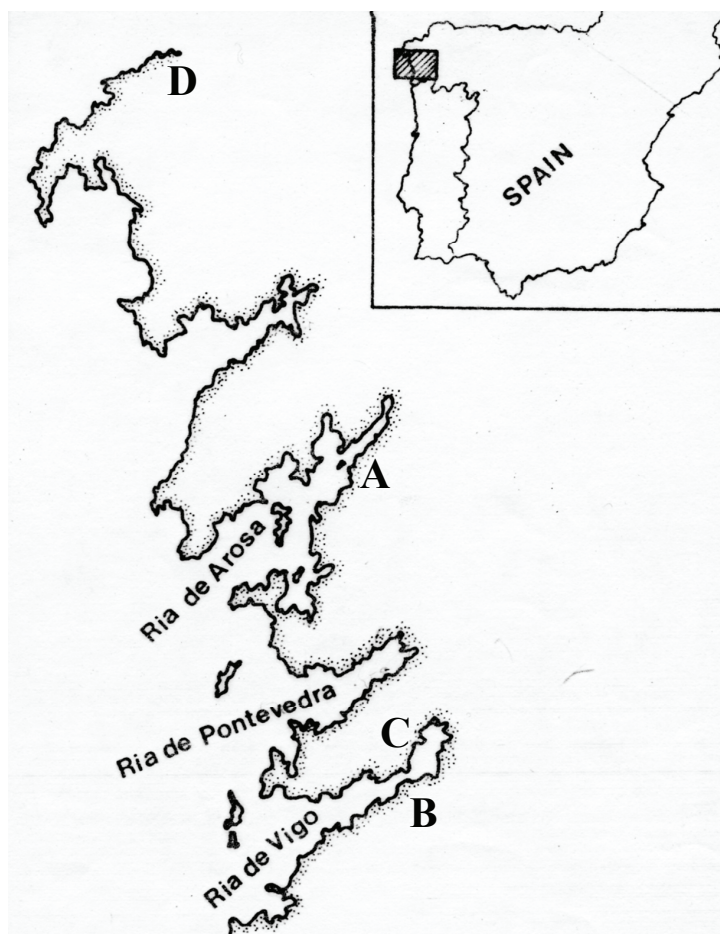
### **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### ***3.2.1. Muestreos y obtención de aislados bacterianos.***

A lo largo de un año y medio se realizaron muestreos mensuales en cuatro cofradías de Galicia: desde Marzo 2004 hasta Septiembre 2005 en Redondela y Vilaboa situadas en la Ría de Vigo y en Carril en la Ría de Arousa; y hasta Junio 2005 en Camariñas en la Ría de Camariñas (Figura 3.1). Las almejas cultivadas, japonesa (*R. philippinarum*) y fina (*R. decussatus*), se transportaron en hielo hasta el laboratorio en un tiempo máximo de 3 horas. Un total de 15-20 individuos se observaron macroscópicamente y se diseccionaron en condiciones asépticas. Se obtuvieron muestras de los órganos: manto, hepatopáncreas, gónada y branquia. Se realizaron homogenados añadiendo solución salina (0.85%) en relación 1:1 (p/v). A partir de esas suspensiones se realizaron diluciones seriadas y se sembraron las diluciones apropiadas en placas de Agar Marino (AM, Pronadisa) y Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS, Oxoid). También se obtuvo muestra del líquido intervalvar y se sembraron sus correspondientes diluciones del mismo modo. Las placas se incubaron a una temperatura de  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante 24 h en el caso de TCBS y hasta un máximo de 10 días en el caso de AM.

Se realizó el recuento de colonias tanto en AM como en TCBS y se procedió al aislamiento de bacterias morfológicamente diferentes. Los aislados se sembraron de

forma rutinaria en placas de AM, se incubaron a  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Los cultivos puros se mantuvieron ultracongelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  en Caldo Marino (Pronadisa) suplementado con 15% de glicerol (v/v).



**Figura 3.1.** Áreas de muestreo en la costa de Galicia. A, Carril; B, Redondela; C, Vilaboa; D, Camariñas.

### **3.2.2. Caracterización fenotípica y análisis de fenones.**

De todos los aislados que se obtuvieron, el estudio se centró en las bacterias anaerobias facultativas del género *Vibrio*. Todas se sometieron a una batería de pruebas fisiológicas y bioquímicas para tratar de determinar su posición taxonómica. Se llevó a cabo una



caracterización fenotípica siguiendo los protocolos clásicos descritos en Mac Faddin (1993), West y col. (1986) y Romalde y col. (1990) que se citan a continuación. Las incubaciones fueron durante 24-48 horas a una temperatura de  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ , excepto para las pruebas de utilización de aminoácidos, tolerancia a sales y a temperaturas que se ampliaron hasta 7-10 días.

- **La morfología y movilidad celulares.** Se determinaron por observación directa al microscopio de contraste de fases (400 X) de una suspensión en CM.
- **Carácter Gram.** Se empleó el método de Buck (1982) con KOH. Se dispersaron unas colonias de cultivo fresco con un palillo estéril sobre un portaobjetos con una gota de KOH (3%). Las bacterias Gram negativas producen un aumento de viscosidad en la solución, mientras que las bacterias Gram positivas no producen ningún cambio.
- **Oxidasa.** Se realizó siguiendo el método de Kovacs (1956). Se impregnó papel de filtro Whatman nº1 con una solución acuosa al 1% de tetrametil-parafenil-diamina y se depositó una fracción de cultivo fresco. La técnica se basa en la detección de la enzima citocromo-oxidasa, las bacterias presentan un color violeta al entrar en contacto con el reactivo (10 s) por la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular.
- **Oxidación/fermentación (O/F) de la glucosa:** El carácter Oxidativo-Fermentativo se realizó utilizando los medios OF de Hugh & Leifson (Difco) y ZOF (Lemos y col. 1985) suplementados con un 1% de glucosa. Se determinó inoculando cada cepa en dos tubos de estos medios, manteniendo uno de ellos en condiciones aeróbicas y otro en anaerobiosis. Si se produce cambio de color a amarillo tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, se considera que el microorganismo posee un metabolismo fermentativo. Si el cambio de color es solo en aerobiosis posee un metabolismo oxidativo.
- **Decarboxilación/dihidrólisis de aminoácidos.** Esta prueba mide la capacidad de un organismo para realizar la decarboxilación o dihidrólisis enzimática de un aminoácido produciendo aminas, con la consiguiente alcalinización del medio. El medio basal utilizado fue el de Moëller (Difco) suplementado con los

aminoácidos L-arginina, L-lisina o L-ornitina a una concentración final del 1% (p/v). Las reacciones son en anaerobiosis. La presencia de turbidez y alcalinización del medio (que lleva como indicadores de pH púrpura de bromocresol y rojo cresol) después de la incubación indican la presencia de la enzima decarboxilasa/dihidrolasa de las cepas estudiadas.

- **Prueba de la producción de ácido y gas de glucosa.** Se realizó con el medio peptona 1%, NaCl 1%, rojo fenol (0.018 g/l) y glucosa 1%. Para determinar la producción de gas se colocó una campana Durham en cada tubo. Un cambio de color en el medio indica la producción de ácido a partir de la fuente de carbono y una burbuja en la campana Durham la producción de gas.
- **Reacción de Indol.** La prueba se realizó en caldo de triptona (Difco) al 1% con NaCl al 1%. Después del tiempo de incubación se adicionaron unas gotas del reactivo de Kovacs (Kovacs 1956). La aparición de un anillo de color rojo en la parte superior del tubo indica que el microorganismo es capaz de producir indol a partir de triptófano.
- **Reducción de Nitrato.** Se empleó el medio con extracto de carne 0.3%, peptona 0.5%, nitrato potásico 0.1% y NaCl 1%. Después del período de incubación se adicionaron los reactivos: (1) 5 g de  $\alpha$ -naftilamina en 1000 ml de ácido acético 5N (30%), y (2) 8 g de ácido sulfanílico en 1000 ml de ácido acético 5N (30%). Si la bacteria realiza la reducción del nitrato a nitrito aparece una coloración rosada.
- **Utilización de citrato.** Se lleva a cabo en tubos de agar inclinados del medio Citrato de Simmons (Difco) al 1% de NaCl. La aparición de color azul intenso en la zona de inclinación del tubo, después del período de incubación, se considera un resultado positivo; la bacteria utiliza el citrato como fuente exclusiva de carbono.
- **Prueba de Voges Proskauer.** Determina la capacidad de algunos microorganismos de producir un compuesto final neutro (acetoína) por la fermentación de la glucosa a través de la ruta butanodiólica. El medio utilizado es el caldo base Rojo de Metilo-Voges Proskauer (MR-VP, Difco), al que se añaden, tras 48 h de incubación, los reactivos  $\alpha$ -naftol (5%) y KOH (40%). La

aparición de una coloración marrón rojiza en la parte superior del tubo en 15-30 min, indica la producción de acetoína.

- **Detección de la gelatinasa.** Esta actividad enzimática se llevó a cabo en medio AM suplementado con 1,5% de gelatina. Tras la incubación la prueba se reveló añadiendo unas gotas de cloruro de mercurio al 1% (p/v) sobre la superficie de las placas sembradas. Las zonas donde la gelatina haya sido hidrolizada se harán

Especie	Procedencia	Origen
<i>V. aestuarianus</i>	ATCC 35048 <sup>T</sup>	Ostra
<i>V. agarivorans</i>	CECT 5085 <sup>T</sup>	Agua de mar
<i>V. alginolyticus</i>	CCM 2575 <sup>T</sup>	Jurel, <i>Trachurus trachurus</i>
<i>V. cincinnatiensis</i>	CECT 4216 <sup>T</sup>	Sangre y fluido cerebro-espinal
<i>V. cyclitrophicus</i>	LMG 21359 <sup>T</sup>	Sedimento marino
<i>V. diazotrophicus</i>	CECT 627 <sup>T</sup>	Erizo de mar, <i>Strongylocentrotus dreobrachiensis</i>
<i>Aliivibrio fischeri</i>	CECT 524 <sup>T</sup>	Agua de mar
<i>V. fluvialis</i>	CECT 4217 <sup>T</sup>	Heces humanas
<i>V. furnisii</i>	CECT 4203 <sup>T</sup>	Heces humanas
<i>V. gallicus</i>	DSM 16639 <sup>T</sup>	Ostra, <i>Crassostrea gigas</i>
<i>V. gazogenes</i>	CECT 5068 <sup>T</sup>	Fango marino
<i>V. harveyi</i>	CECT 525 <sup>T</sup>	Anfípodo, <i>Talorchestia</i> sp
<i>V. lentus</i>	CECT 5110 <sup>T</sup>	Ostra
<i>Aliivibrio logei</i>	NCIMB 1143	Agua de mar
<i>V. mediterranei</i>	CECT 621 <sup>T</sup>	Sedimento marino
<i>V. mytili</i>	CECT 632 <sup>T</sup>	Mejillón, <i>Mytilus edulis</i>
<i>V. natriegens</i>	ATCC 14048 <sup>T</sup>	Fango marismal
<i>V. nereis</i>	ATCC 25917 <sup>T</sup>	Agua de mar
<i>V. ordalii</i>	NCIMB 2167 <sup>T</sup>	Salmón Coho, <i>Oncorhynchus kisutch</i>
<i>V. pectenica</i>	A365 <sup>T</sup>	Vieira, <i>Peten maximus</i>
<i>V. pelagius I (Listonella)</i>	NCIMB 1900 <sup>T</sup>	Agua de mar
<i>V. pelagius II</i>	RI 152.1	Rodaballo, <i>Scophthalmus maximus</i>
<i>V. pomeroyi</i>	LMG 20537 <sup>T</sup>	Larvas de bivalvo, <i>Nodipecten nodosus</i>
<i>Aliivibrio salmonicida</i>	NCIMB 2262 <sup>T</sup>	Salmón atlántico, <i>Salmo salar</i>
<i>V. scophthalmi</i>	CECT 4638 <sup>T</sup>	Rodaballo, <i>Scophthalmus maximus</i>
<i>V. splendidus I</i>	ATCC 33125 <sup>T</sup>	Pez marino
<i>V. splendidus II</i>	PC 670.1	Rodaballo, <i>Scophthalmus maximus</i>
<i>V. superstes</i>	DSM 16383 <sup>T</sup>	Oreja de mar, <i>Halotis rubra</i>
<i>V. tapetis</i>	CECT 4600 <sup>T</sup>	Almeja japonesa, <i>Ruditapes philippinarum</i>
<i>V. tasmaniensis</i>	LMG 21574 <sup>T</sup>	Salmón atlántico, <i>Salmo salar</i>

visibles al aparecer un área clara, que contrasta con la opacidad del resto del medio e indica un resultado positivo.

- **Detección de la lipasa.** Esta prueba se realizó en el medio AM suplementado con Tween 80 a una concentración final del 1%. La aparición de halos opacos alrededor de las colonias indica la producción de esta enzima.
- **Hidrólisis de almidón.** Este ensayo se realizó en placas de AM suplementadas con almidón al 0,4%. Las placas se revelaron mediante la adición del reactivo Lugol. La aparición de zonas claras alrededor de las colonias indica la presencia de la enzima amilasa en las cepas estudiadas.
- **Hidrólisis de esculina.** Se determinó en placas de AM con un 0,1% de esculina y 0,05% de citrato férrico. Se considera un resultado positivo el ennegrecimiento del medio alrededor de las colonias.
- **Tolerancia a sales.** El estudio del requerimiento salino para el crecimiento de los aislados se realizó en el medio basal (neopeptona 0,4%, extracto de levadura 0,1%, agar 1,5%) suplementado con concentraciones de NaCl (0, 0,5, 3, 6 y 8 %). Las placas se incubaron a una temperatura de  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$  un máximo de 7 días.
- **Tolerancia a la temperatura.** El rango de temperatura de crecimiento se determinó en placas de AM mediante la incubación a diferentes temperaturas (4, 25, 37 y  $44^{\circ}\text{C}$ ) (un máximo de 10 días sólo para el crecimiento a  $4^{\circ}\text{C}$ ).
- **Sensibilidad la agente vibriostático o pteridina (O/129 150 µg).** Se empleó el método de difusión en Agar Müller-Hinton (Oxoid) con NaCl al 1% (MHA-1). Se utilizaron discos comerciales (Oxoid). Los halos de inhibición se determinaron después de incubar las placas a  $25^{\circ}\text{C}$ .

Las pruebas fenotípicas también se realizaron con las cepas tipo correspondientes a los grupos fenotípicos obtenidos de todos los aislados caracterizados, para asegurarse un perfil bioquímico igual o similar. Las cepas tipo utilizadas en el estudio se muestran en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1.** Cepas bacterianas de referencia utilizadas en este estudio.

Los datos fenotípicos obtenidos se analizaron mediante taxonomía numérica utilizando el programa Mega versión 4.0. El dendrograma se realizó mediante el algoritmo UPGMA (unweighted pair group method analysis).

### **3.3. RESULTADOS**

#### ***3.3.1. Evolución de la carga bacteriana en el tiempo.***

Los muestreos mensuales en 4 cofradía de Galicia se realizaron desde Marzo 2004 hasta Junio 2005 en Camariñas, prolongándose hasta Septiembre en Redondela, Vilaboa y Carril. En todas las cofradías se analizaron poblaciones de almeja japonesa (*R. philippinarum*), mientras que en la cofradía de Camariñas se analizó también almeja fina (*R. decussatus*).

Los resultados se presentan como un análisis de la evolución de la media de la carga bacteriana de todos los órganos analizados en los medios de cultivo AM y TCBS (Figura 3.2). También se realiza un análisis por separado de los órganos: hepatopáncreas, manto, branquia y gónada, así como de líquido intervalvar (Figuras 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 y 3.7).

En Redondela, los máximos valores de carga bacteriana se registraron en el rango de  $2,4-7,7 \times 10^6$  UFC/g de tejido en AM (Julio-Agosto 2004, Julio 2005) y de  $4,2-9,5 \times 10^5$  UFC/g de tejido en TCBS (Julio 2004, 2005). Los recuentos mínimos obtenidos fueron de  $3,9 \times 10^4$  -  $1,5 \times 10^5$  UFC/g de tejido en AM (Abril 2004, Octubre 2005) y de  $1,2-2,9 \times 10^3$  UFC/g de tejido en TCBS (Diciembre 2004, Enero 2005) (Figura 3.3).

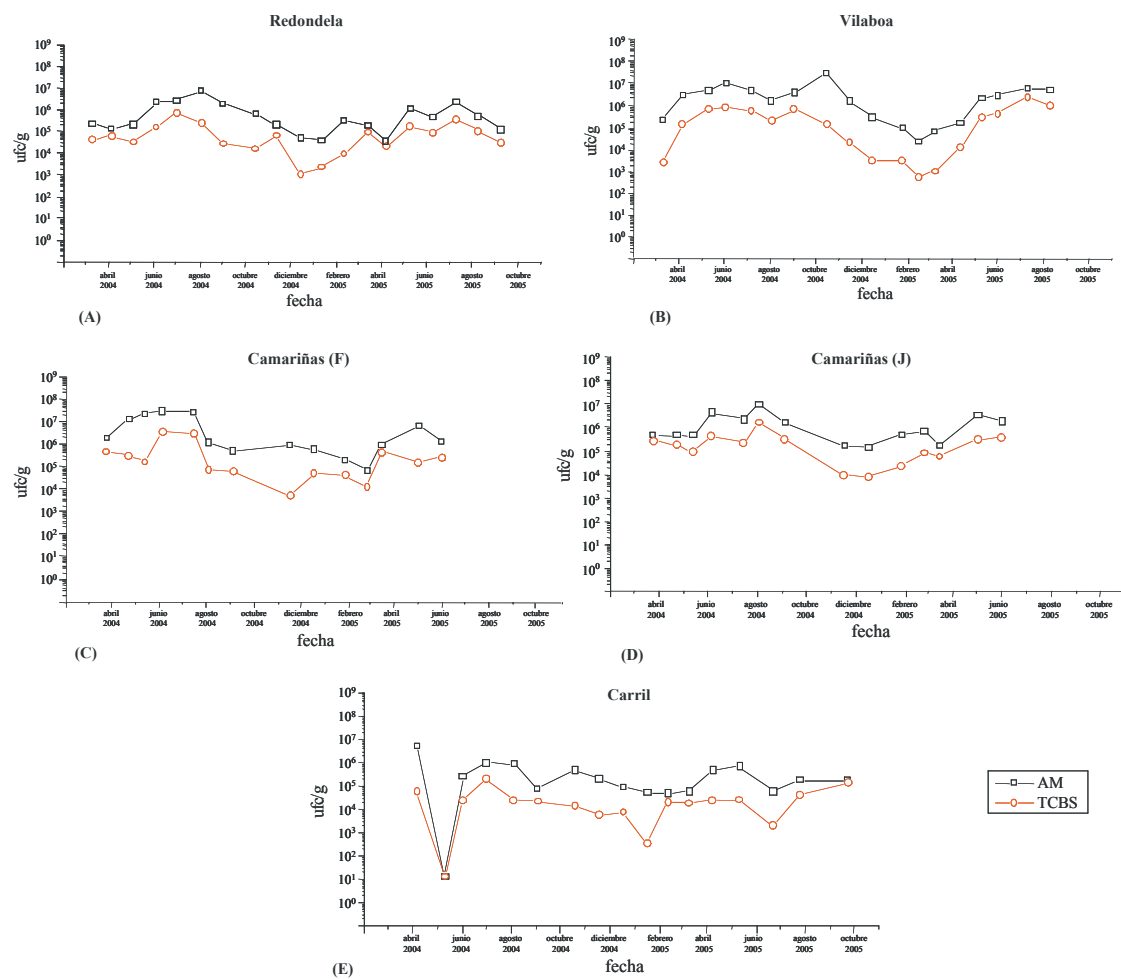
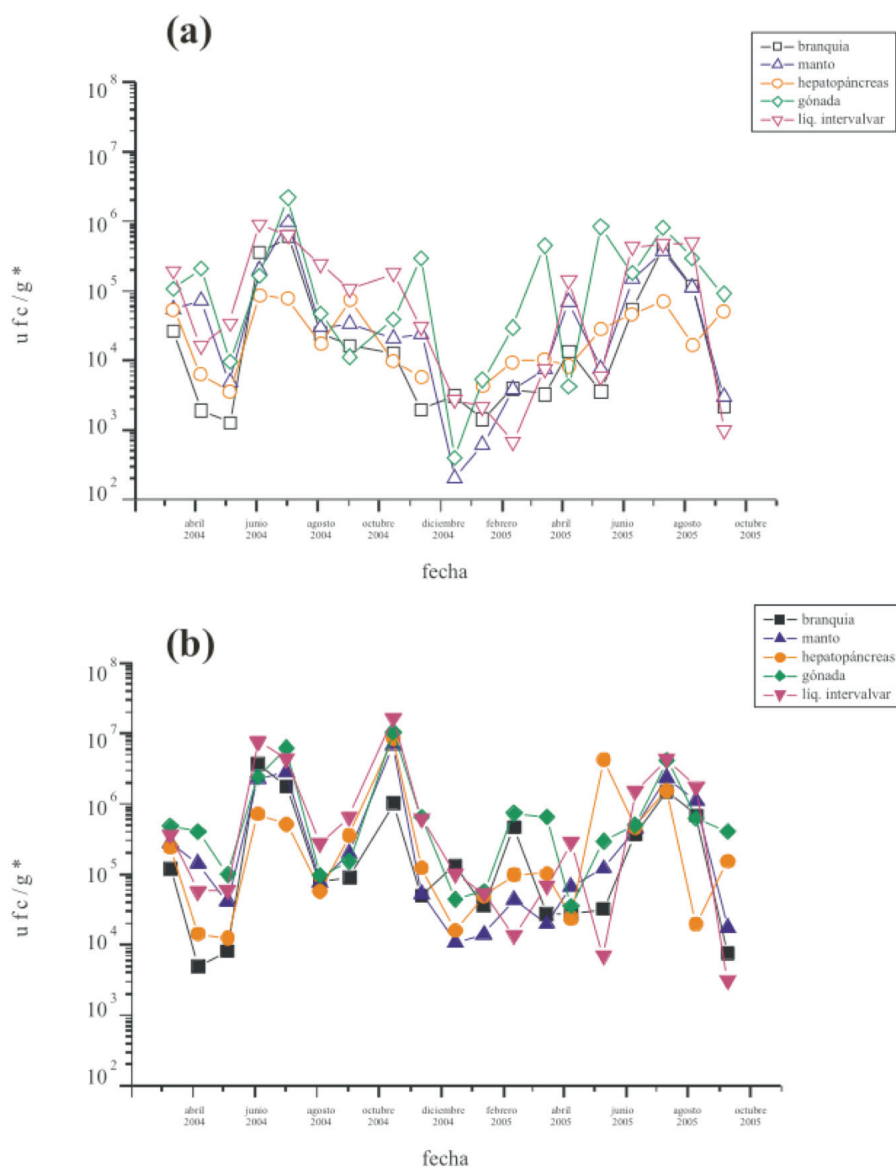


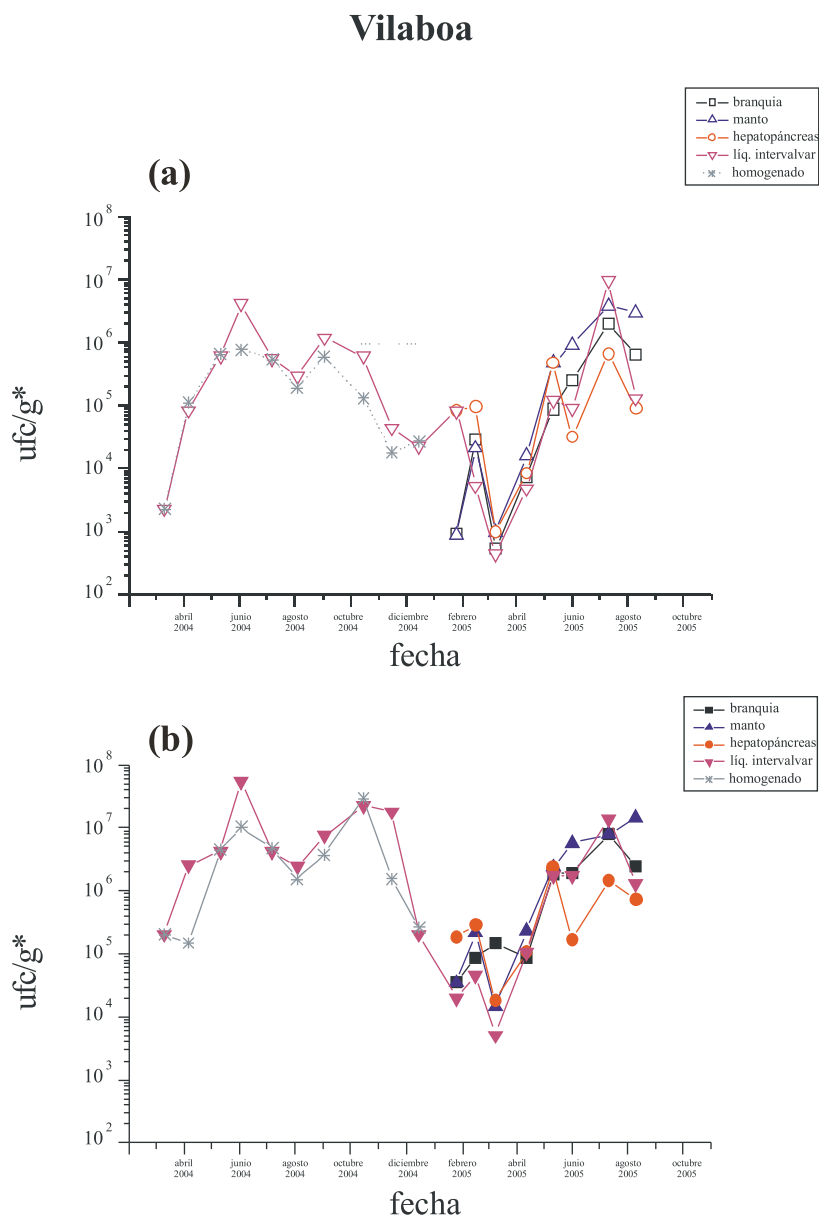
figura 3.2. Evolución de la media de la carga bacteriana de todos los órganos analizados.

## Redondela



**Figura 3.3.** Recuentos bacterianos en órganos y líquido intervalvar de almeja fina en Redondela. A) TCBS, B) AM. \*Unidades formadoras de colonias por gramo en órganos, en líquido intervalvar por ml.

En Vilaboa los mayores recuentos de bacterias totales fueron de  $5,8 \times 10^6$  -  $2,9 \times 10^7$  UFC/g y de Vibrios en TCBS de  $2,2 \times 10^5$  -  $7,8 \times 10^5$  UFC/g (Junio y Octubre 2004, Junio, Julio y Agosto 2005). Los valores mínimos oscilaron entre  $1,5$ - $2,65 \times 10^5$  UFC/g en AM y entre  $4,89 \times 10^2$  -  $2,3 \times 10^3$  UFC/g en TCBS (Marzo 2004, Enero, Febrero y Marzo 2005) (Figura 3.4).



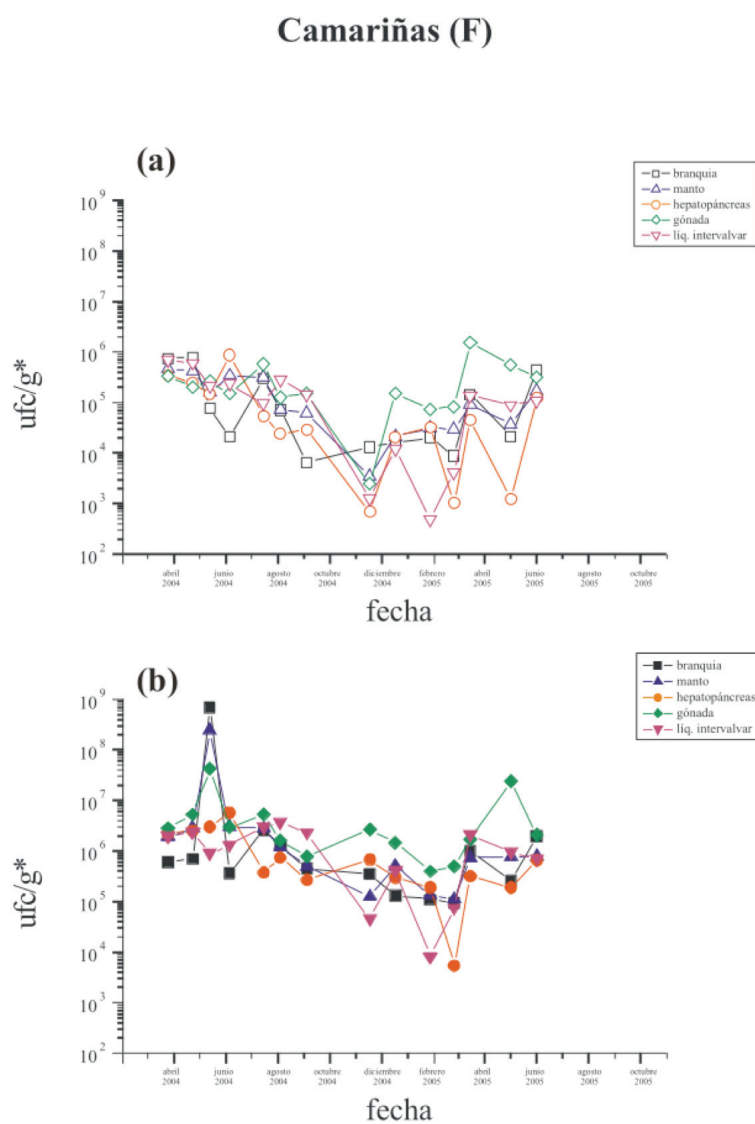
**Figura 3.4.** Recuentos bacterianos en órganos y líquido intervalvar de almeja japonesa en Vilaboa. A) TCBS, B) AM. \*Unidades formadoras de colonias por gramo en órganos, en líquido intervalvar por ml.



En la cofradía de Camariñas la evolución de los recuentos de bacterias totales y vibrios, tanto en almeja fina como en almeja japonesa, fue muy parecida. En almeja fina los valores máximos abarcan un rango de  $1,3-3,0 \times 10^7$  UFC/ g en AM y de  $5 \times 10^5 - 3,5 \times 10^6$  UFC/g en TCBS (Mayo-Agosto 2004, Mayo-Junio 2005). Los mínimos alcanzaron valores entre  $7 \times 10^4$  y  $2,1 \times 10^5$  UFC/g en AM y entre  $4 \times 10^3$  y  $4 \times 10^4$  UFC/ g en TCBS (Noviembre 2004, Enero, Febrero 2005) (Figura 3.5). En almeja japonesa se alcanzaron máximos valores en un rango de  $4,4 \times 10^6 - 1 \times 10^7$  UFC/g en AM y de  $2,0-5,0 \times 10^5$  UFC/g en TCBS (Junio-Agosto 2004, Mayo-Junio 2005). Los mínimos fueron de  $1,4-5,0 \times 10^5$  UFC/g en AM y de  $7,6-8,9 \times 10^3$  UFC/ g en TCBS (Noviembre, Diciembre 2004) (Figura 3.6).

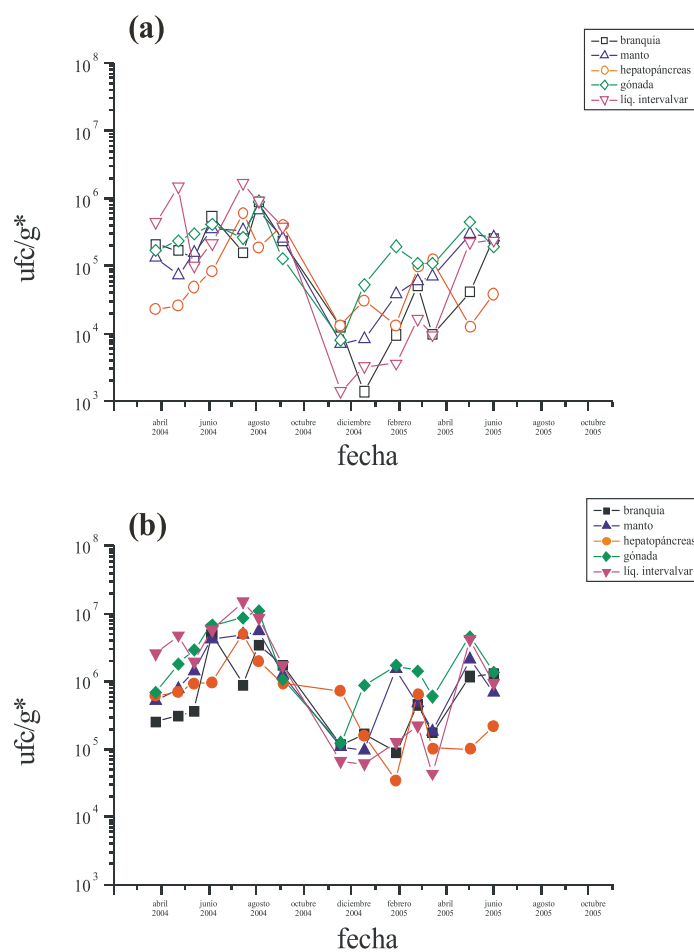
En Carril los recuentos siguieron la misma pauta de ascenso estacional, con máximos recuentos de  $2,0-9,7 \times 10^6$  UFC/g en AM y de  $1,3-2,0 \times 10^5$  UFC/g en TCBS (Junio, Julio 2004, Abril, Mayo y Julio 2005). Los mínimos se obtuvieron en Mayo del año 2004 con un importante descenso hasta valores de  $1-1,3 \times 10^1$  UFC/g en AM y TCBS. Excepto este evento atípico los recuentos más bajos fueron de  $1,84 \times 10^3$  UFC/g en AM (Octubre 2005) y de  $2,2-3,7 \times 10^2$  UFC/g en TCBS (Enero y Octubre 2005) (Figura 3.7).

Los recuentos en el medio específico para vibrios son, como era de esperar, siempre inferiores a los de AM, aunque variando la proporción. Claramente se observa que el recuento de colonias tanto en AM como en TCBS de todas las cofradías sigue la tendencia de incrementar con la subida estacional de la temperatura en los meses de verano. Las diferencias máximas entre vibrios y bacterias totales se registraron en los meses más fríos, siendo mínimas en los meses de verano debido a un mayor aumento de la población de vibrios.



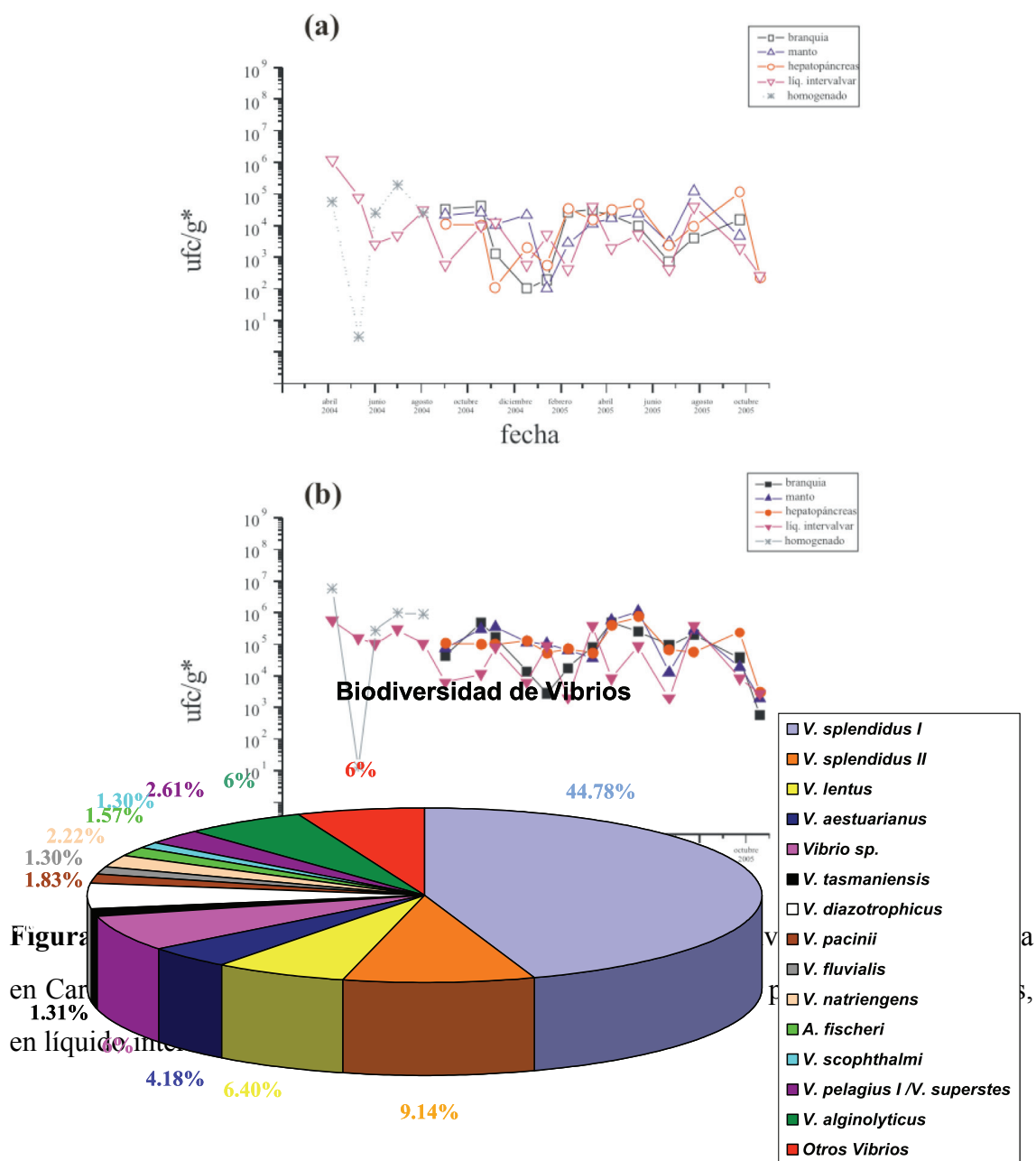
**Figura 3.5.** Recuentos bacterianos en órganos y líquido intervalvar de almeja fina en Camariñas. A) TCBS, B) AM. \*Unidades formadoras de colonias por gramo en órganos, en líquido intervalvar por ml.

**Camariñas (J)**



**Figura 3.6.** Recuentos bacterianos en órganos y líquido intervalvar de almeja japonesa en Camariñas. A) TCBS, B) AM. \*Unidades formadoras de colonias por gramo en órganos, en líquido intervalvar por ml.

## Carril



En el análisis de los recuentos de los distintos órganos y del líquido intervalvar no se apreciaron diferencias importantes. El patrón es común a todos los órganos, y similar al obtenido cuando se considera la media, aunque es importante destacar que los niveles de bacteria en la gónada en todas las cofradías son altos, especialmente en los casos de Redondela y en almeja fina de Camariñas (Figuras 3.3-3.7).

### **3.3.2. Caracterización fenotípica de aislados bacterianos del género *Vibrio*.**

En base a 27 características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas se asignaron un total de 768 aislados al género *Vibrio*. Se realizó una taxonomía numérica mediante el método UPGMA que agrupó las cepas en 32 fenones (Figura 3.9), los perfiles fenotípicos se muestran en la Tabla 3.2.

La especie más abundante fue *V. splendidus* constituyendo un 53.92% del total de los aislados. El biotipo I fue el más común constituyendo el 44,78% del total, y el biotipo II el 9,14%. Los siguientes grupos fenotípicos más numerosos fueron *V. lentus* (6,4%), *V. alginolyticus* (6,00%), *V. diazotrophicus* (4,70%), *V. aestuarianus* (4,18%) y *V. pelagius* I / *V. superstes* (2,61%) (Figura 3.8). El resto de los grupos tenían menos de 20 aislados.

**Figura 3.8.** Porcentajes obtenidos de las especies de *Vibrio* más prevalentes en almejas cultivadas.

El fenón F1 está compuesto por 343 aislados, presenta heterogeneidad y se divide en 2 grupos en el dendrograma con 291 y 52 aislados. Los caracteres variables fueron el crecimiento a 37°C y a distintas concentraciones de NaCl (0,5%, 3%, 6% y 8%). Sus perfiles permitieron identificarlos como *V. splendidus* biotipo I, agrupándose la cepa tipo ATCC 33125<sup>T</sup> con el grupo de 291 aislados. Los dos grupos se sitúan en el dendrograma cerca de especies fenotípicamente muy similares. La especie *V. splendidus* se considera heterogénea pudiendo enmascarar la presencia de otras especies relacionadas.

El fenón F2 está formado por 70 aislados. Se diferencia del fenón F1 en la capacidad de utilizar el aminoácido arginina, y el perfil fenotípico permitió identificar los aislados como *V. splendidus* biotipo II. La cepa control PC 670.1, aislada a partir de pez e identificada previamente como *V. splendidus* II, se agrupó con el resto de las cepas.

El fenón F3 presenta 46 cepas identificadas como *V. alginolyticus*. Su posición en el dendrograma aparece distante en comparación con el resto de los vibrios, probablemente debido a sus inusuales características dentro del género: resistencia al agente vibriostático y tolerancia a temperaturas y salinidades extremas. En el estudio se incluyó la cepa tipo CCM 2575<sup>T</sup> que se agrupó en el mismo fenón.

El fenón F4, identificado como *V. diazotrophicus*, está compuesto por 36 aislados; la cepa tipo LMG 21359<sup>T</sup> se agrupó con el resto de los aislados. Se sitúa muy próxima a *V. tasmaniensis* (F12) pudiéndose diferenciar en la prueba de la arginina dihidrolasa y en el crecimiento al 6% de NaCl en la mayoría de las cepas.

El fenón F5, identificado como *V. aestuarianus*, presenta 32 aislados y la cepa tipo ATCC 35048<sup>T</sup>. Los aislados de almeja identificados como *V. aestuarianus* se diferenciaron de *V. splendidus* I en la prueba de la enzima amilasa. El fenón *V. lentus* (F11) (49 cepas) se sitúa cerca de *V. aestuarianus* y dentro del grupo *V. splendidus*-like.

Ambas especies se diferencian claramente en las pruebas de la amilasa y del agente vibriostático.

El fenón F6 agrupa 20 aislados identificados como *V. pelagius* I /*V. superstes*. La cepa tipo de *V. superstes* (DSM 16383<sup>T</sup>) se incluye en el “cluster” así como una cepa aislada de pez previamente identificada como *V. pelagius* I (RQ 212.1). Próxima a este fenón aparece la especie *V. scopthalmi* (F14), pero se diferencian en la prueba de la arginina dihidrolasa en todas las cepas y en el 75% de las cepas en el crecimiento al 6% de NaCl.

El fenón F7, identificado como *V. fluvialis*, incluye 10 cepas y la cepa tipo CECT 4217<sup>T</sup>, y el fenón F25, identificado como *V. furnisii*, incluye 3 cepas y la cepa tipo CECT 4203<sup>T</sup>. Ambas especies son similares fenotípicamente y crecen en un amplio rango de temperaturas y salinidades, aunque se diferencian en la producción de gas, positiva para *V. furnisii*.

Los fenones F8, F10, F12, F13 y F14 se identificaron como *V. natriegens* (17 cepas y la cepa tipo ATCC 14048<sup>T</sup>), *V. pacinii* (14 cepas), *V. tasmaniensis* (10 cepas y la cepa tipo LMG 21574<sup>T</sup>), *A. fischeri* (12 cepas y la cepa tipo CECT 524<sup>T</sup>) y *V. scopthalmi* (10 cepas y la cepa tipo CECT 4638<sup>T</sup>) respectivamente. *V. natriegens* y *A. fischeri* están próximas, diferenciándose por la prueba de la lisina decarboxilasa. *V. pacinii* se encuentra cerca de la especie *V. mytili* (F19), pero ambas se diferencian mediante las pruebas enzimáticas gelatinasa y amilasa y en el crecimiento a una temperatura de 4°C.

Otros fenones con un número menor de aislados fueron el F15, *V. cyclitrophicus* (6 cepas), F16, *V. ordalii* (6 cepas), F17, *V. harveyi* (6 cepas y la cepa tipo CECT 525<sup>T</sup>), F18, *V. nereis* (5 cepas), F20, *V. tapetis* (4 cepas y la cepa tipo CECT 4600<sup>T</sup>) y F21, *V. pelagius* II (4 cepas). Los perfiles fenotípicos de las especies *V. tapetis* y *V. pelagius* II son muy similares, diferenciándose solo en las pruebas de la gelatinasa y crecimiento al 6% de NaCl.

El “cluster” de *V. harveyi* aparece en el dendrograma muy cerca de *V. alginolyticus* ya que comparten características en sus perfiles. Se diferenciaron mediante observación de “swarming” en las placas de *V. alginolyticus*, y por las pruebas del agente vibriostático y lipasa.

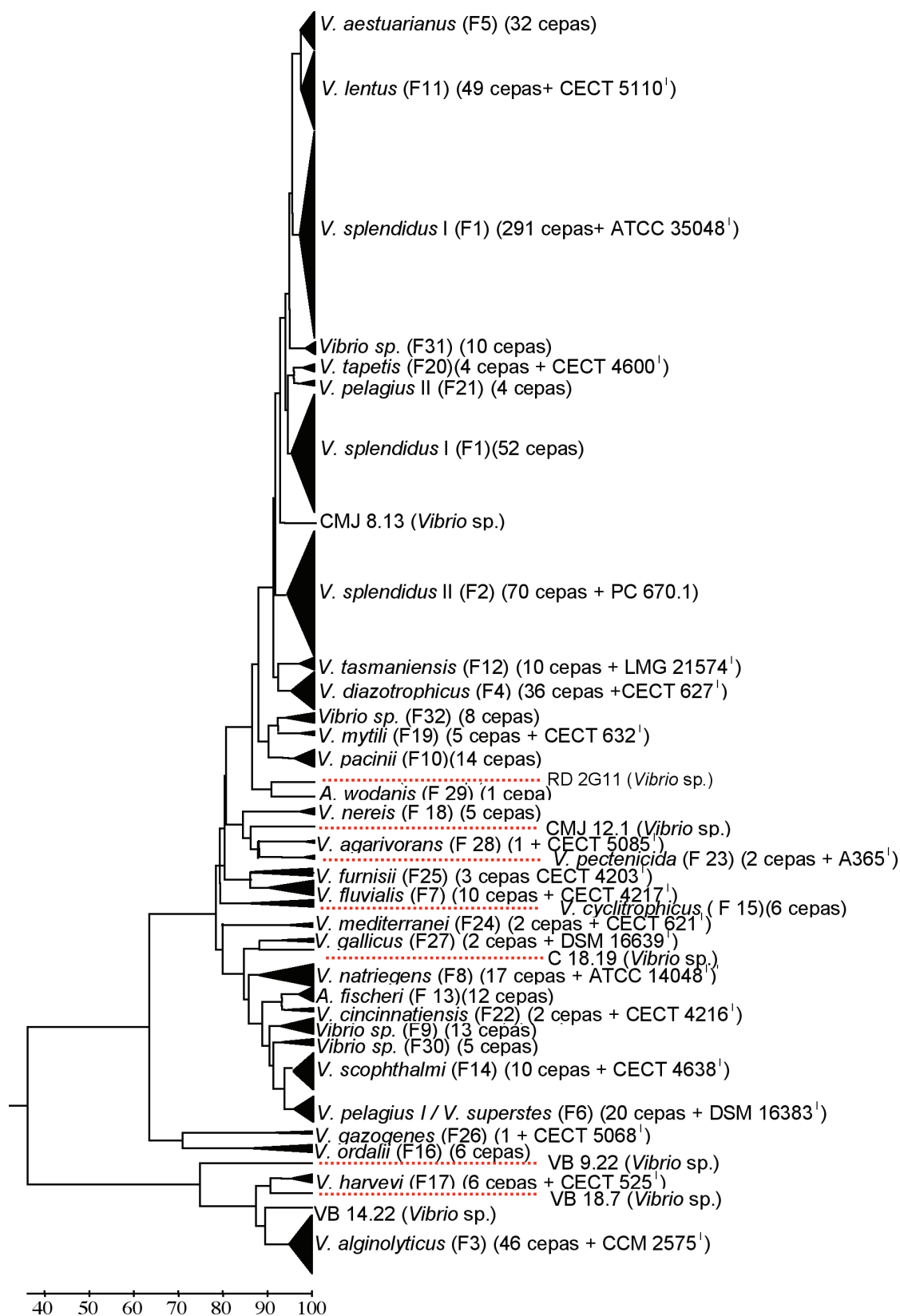
Los fenones con 1 ó 2 aislados son el F22, *V. cincinnatiensis* (2 cepas y la cepa tipo CECT 4216<sup>T</sup>), F23, *V. pectenica*, (2 cepas y la cepa tipo A365<sup>T</sup>), F24, *V. mediterranei* (2 cepas y la cepa tipo CECT 621<sup>T</sup>), F26, *V. gazogenes* (1 cepa y la cepa tipo CECT 5068<sup>T</sup>), F27, *V. gallicus* (2 cepas y la cepa tipo DSM 16639<sup>T</sup>), F28, *V. agarivorans* (1 cepa y la cepa tipo CECT 5085<sup>T</sup>) y F29, *V. wodanis* (1 cepa). *V. mediterranei* y *V. gallicus* están muy próximas, diferenciándose en la movilidad y en la lisina decarboxilasa. Las especies *V. agarivorans* y *V. pectenica*, próximas en el dendrograma, difieren en la prueba de la amilasa y en el crecimiento bacteriano en TCBS, a una temperatura de 4°C y a concentraciones de 0,5% y 8% de NaCl.

Los aislados que no pudieron ser asignados a una especie fueron incluidos en los fenones F9 (13 cepas), F30 (5 cepas), F31 (10 cepas) y F32 (8 cepas). Los fenones F9 y F30 están juntos y próximos a *V. scopthalmi*, *V. cincinnatiensis* y *A. fischeri*. El fenón F31 se sitúa cerca de *V. splendidus* I y *V. tapetis*; y el fenón F32 cerca de *V. mytili* y *V. diazotrophicus*. Hubo 6 aislados que no se juntaron con ningún “cluster”, ni tampoco se les asignaron fenones. El aislado CMJ 8.13 se sitúa cerca de *V. splendidus* I y II, RD 2G11 cerca de *A. wodanis*, CMJ 12.1 cerca de *V. nereis* y *V. agarivorans*, VB 9.22, VB 18.7 y VB 14.22 cerca de *V. alginolyticus* y *V. harveyi*.



**Tabla 3.2.** Características fenotípicas de los fenones. V= variable, ND= no determinado, números son porcentajes de cepas positivas. Todas las cepas son fermentativas, bacilos Gram negativos, oxidasa positivos y no crecen al 0% de NaCl. Fenones: **F1**, *V. splendidus* I; **F2**, *V. splendidus* II; **F3**, *V. alginolyticus*; **F4**, *V. diazotrophicus*; **F5**, *V. aestuarius*; **F6**, *V. pelagius* I; *V. superstes*; **F7**, *V. alvinis*; **F8**, *V. natronigenus*; **F9**, *V. alvinis* sp.; **F10**, *V. parvum*; **F11**, *V. lentus*; **F12**, *V. taylorianus*; **F13**, *A. fischeri*; **F14**, *V. scaphthalini*; **F15**, *V. quilibrochus*; **F16**, *V. cordali*; **F17**, *V. herveyi*; **F18**, *V. nereis*; **F19**, *V. mytili*; **F20**, *V. tenebris*; **F21**, *V. pelagius* II; **F22**, *V. ananastatus*; **F23**, *V. pectinatus*; **F24**, *V. mediterranei*; **F25**, *V. tumida*; **F26**, *V. gazogenes*; **F27**, *V. gallus*; **F28**, *V. agassizianus*; **F29**, *A. woodii*; **F30**, *Vibrio* sp.; **F31**, *Vibrio* sp.; **F32**, *Vibrio* sp.

Grupo fenotípico	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20	F21	F22	F23	F24	F25	F26	F27	F28	F29	F30	F31	F32
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	87	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en TCBS	+	+	+	+	+	80	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O / 129 (180µg)	8	8	62	8	8	8	71	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
ADH	+	-	-	93	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	86	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	+	+	+	79	+	-	71	-	-	-	93	-	-	-	29	-	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinasa	+	+	+	-	-	6	42	-	87	+	-	-	-	9	86	50	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amilasa	+	+	+	93	-	-	75	68	-	+	+	85	8	-	37	17	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipasa	98	97	48	66	+	9	31	75	73	+	77	80	9	+	17	+	+	+	ND	25	ND	67	+	+	+	-	ND	ND	80	+	+	+
Reducción de nitratos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	94	+	17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rojo Metilo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas de glucosa	+	+	69	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	+	+	86	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 °C	91	92	10	39	90	90	-	63	+	-	86	92	73	91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37 °C	18	19	+	17	12	10	25	53	-	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44 °C	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 % NaCl	16	12	+	7	9	13	79	10	-	20	ND	-	-	9	43	17	40	ND	-	-	-	67	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3 % NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6 % NaCl	98	97	+	+	91	26	+	95	75	+	ND	15	13	+	+	+	+	+	+	+	+	33	+	+	+	+	+	+	+	80	+	+
8 % NaCl	29	28	92	15	25	10	36	16	ND	53	-	15	-	18	86	66	50	40	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



**Figura 3.9.** Dendrograma mostrando las relaciones entre los “clusters” definidos en la caracterización fenotípica. (UPGMA).

### 3.4. DISCUSIÓN

El presente estudio taxonómico se centró en los aislados del género *Vibrio* obtenidos a partir de almejas cultivadas, *R. philippinarum* y *R. decussatus*, en distintos puntos geográficos de las Rías Gallegas. Se observó una gran diversidad aunque con clara dominancia de algunas especies, principalmente *V. splendidus*. La composición específica de *Vibrio* obtenida en la almeja gallega fue similar a los resultados recogidos en otros trabajos (Ortigosa y col. 1989, Montilla y col. 1994, Pujalte y col. 1999 y Castro y col. 2002). En este estudio las especies predominantes fueron *V. splendidus* (53,9%), *V. lentus* (6,4%) y *V. alginolyticus* (6,0%). En menor proporción se aislaron *V. pelagius* (2,6%), *V. fluvialis* (1,3%) y *V. harveyi* (0,8%). No se aisló ninguna cepa de *V. tubiashii*, a diferencia de los estudios realizados por Castro y col. (2002) y Montilla y col. (1994). La ausencia o escasa presencia de algunas especies abundantes en otros estudios pudo ser debido bien a una microbiota diferente o bien una identificación preliminar errónea, pudiéndose encontrar estas especies enmascaradas en otros fenones.

La diversidad bacteriana fue similar en las distintas cofradías, no pudiéndose relacionar con distintas zonas geográficas. Estos resultados son comparables con el estudio realizado por Arias y col. (1999) que vincularon la composición bacteriana específica en bivalvos a variaciones estacionales, pero no a zonas geográficas. En este estudio se observó una mayor presencia de la especie *V. alginolyticus* en los meses más cálidos, pero la especie que predominó durante todo el tiempo del muestreo fue *V. splendidus*. Arias y col. (1999) también observaron una mayor incidencia de las especies *V. alginolyticus* y *V. harveyi* en los meses de verano, siendo *V. splendidus* la especie dominante durante todo el año.

Los recuentos de colonias en placa demostraron que la carga bacteriana en las cuatro zonas geográficas es muy similar, oscilando en un rango de  $10^5$ - $10^7$  UFC/g de tejido en AM, y  $10^4$ - $10^6$  UFC/g en TCBS, dependiendo de la época del año. Los máximos valores tanto de bacterias totales como de vibrios en almejas se registraron en los meses de verano y principios de otoño, coincidiendo con otros estudios de poblaciones bacterianas en bivalvos. Ortigosa y col. (1989) obtuvieron recuentos entre  $10^5$  y  $10^7$

UFC/g de mejillón. Arias y col. (1999) obtuvieron valores entre  $3,0 \times 10^5$  y  $1,9 \times 10^7$  UFC/g de distintos bivalvos en AM, y entre  $3,0 \times 10^2$  y  $5,0 \times 10^5$  UFC/g en TCBS. Montilla y col. (1994) registraron la incidencia más alta de vibrios en bivalvos del Delta del Ebro en verano y principios de Otoño, resultados que coincidieron con otros obtenidos en ostra plana en el Mediterráneo (Ortigosa y col. 1989).

Las diferencias entre bacterias totales y vibrios disminuyeron en los meses de verano debido a la mayor proliferación y dominancia de los vibrios en respuesta a la subida de la temperatura, lo que significa un mayor riesgo para el desarrollo del molusco, especialmente si los mecanismos de defensa del hospedador están debilitados debido a factores como la maduración sexual y desove o condiciones adversas en el medio (Volety y col. 1999).

Con respecto a los diferentes órganos, la carga bacteriana es parecida. En general se apreciaron valores más altos en la gónada, tanto de bacterias totales como de vibrios. La presencia de potenciales patógenos constituye un riesgo debido a la posible transmisión vertical a la progenie. Por tanto se podría considerar como un órgano importante en los muestreos para la búsqueda de diversidad bacteriana así como de posibles patógenos.

En Mayo del año 2004 hubo un importante descenso en el recuento bacteriano (de  $10^7$  a  $10^1$  UFC/g) en los tejidos de las almejas de Carril. Este evento atípico se produjo debido a las altas precipitaciones y la consiguiente bajada brusca de la salinidad en el agua de mar. En aquel episodio se detectaron niveles de salinidad de 26,5 ppm, cuando la salinidad normal de la Ría es de 30 ppm.

Con respecto a la caracterización fenotípica de los 768 vibrios aislados las pruebas realizadas lograron agruparlos en fenones, en algunos casos diferenciando especies fenotípicamente similares. Noguerola y Blanch (2008) han propuesto recientemente una tabla de identificación fenotípica para casi todos los vibrios descritos. Con alguna excepción, los resultados de este estudio están más o menos de acuerdo con el sistema de identificación propuesto en su trabajo. Se observaron discrepancias en varias

características de algunas especies, como crecimiento a distintas temperaturas y salinidades o el ensayo Voges Proskauer en *V. diazotrophicus*, *V. scopthalmi* y *V. natriegens*. Estos desacuerdos probablemente se deban a que los autores estudiaron sólo las cepas tipo de las distintas especies en lugar de un número mayor de aislados ambientales como se incluyen en este trabajo.

En el dendrograma realizado mediante la taxonomía numérica los aislados de *V. splendidus* biotipo I se distribuyeron en 2 grupos debido a una gran variabilidad en el crecimiento a distintas temperaturas y salinidades. Las especies dentro del grupo *V. splendidus* son muy parecidas y casi imposible de diferenciar mediante caracterización fenotípica. De hecho, con una similitud mayor del 90% se distinguen al menos 6 especies distintas. Esto explicaría la necesidad de recurrir en muchos casos a métodos genéticos para la identificación a nivel de especie.

De las 768 cepas, 43 no se identificaron a nivel de especie mediante las pruebas realizadas, apuntando la posibilidad de nuevas especies fenotípicamente similares a los fenones cercanos.

Los datos aportados han revelado una gran diversidad de especies del género *Vibrio* presentes en almejas gallegas. Se demuestra que la temperatura es el principal factor determinante para su proliferación, aunque hasta ahora se conoce poco sobre otros factores como las relaciones de dominancia entre distintas especies, con los distintos órganos del bivalvo o con la localización geográfica. En otros estudios la microbiota de moluscos bivalvos se ha examinado principalmente en busca de microorganismos patógenos capaces de causar enfermedades en humanos mediante el consumo, investigándose la contaminación fecal, patógenos entéricos y especies de vibrios patógenas en humanos. Pocos trabajos han descrito las poblaciones bacterianas asociadas al cultivo de bivalvos. En este trabajo se ha realizado un agrupamiento e identificación preliminar de 768 vibrios a partir de almejas cultivadas. Una caracterización genética y análisis filogenético permitirán esclarecer las posiciones taxonómicas de cepas representativas de los fenones descritos con mayor exactitud.

### **III. BACTERIA ASSOCIATED TO CLAM CULTURE**

## **BACTERIA ASSOCIATED WITH THE CULTURE OF CLAMS.**

In the literature, studies analyzing the diversity, distribution and density of marine bacteria associated with bivalve molluscs are scarce. These studies date back to the 1960's until today, and results have agreed in the dominance of Gram negative over Gram positive bacteria in the total composition in molluscs, as well as the high abundance of bacteria belonging to the genus *Vibrio* (Colwell & Liston 1961, Kueh & Chan 1985, Prieur *et al.* 1990, Pujalte *et al.* 1999). Various works performed on the identification of *Vibrio* species in molluscs agree in the dominance of some species like *V. splendidus*, *V. harveyi* and *V. alginolyticus*, although they have slight differences in the total composition. *V. harveyi* has been related with the warm season and *V. splendidus*, although present during the whole year, is dominant in the winter (Arias *et al.* 1999, Pujalte *et al.* 1999, Lida *et al.* 2000). However the phenotypic profiles for vibrios are highly diverse making difficult their identification to species level.

Although the genus *Vibrio* has been extensively studied, many species have not been identified or are masked under another scientific classification. *Vibrio* is known to be the most pathological genus which affects the culture of bivalves. Therefore, a greater knowledge on their biodiversity may aid in the understanding of the relation host-bacteria-environment.

In this study, sampling was performed monthly on four different clam culture localities in Galicia (Redondela, Vilaboa, Camariñas and Carril) for 1 year and 6 months (Fig. 3.1). Populations of Manila clam (*R. philippinarum*) were analysed for all locations. In the region of Camariñas also Carpet Shell clams (*R. decussatus*) were analysed. Colonies on the Marine Agar (MA, Pronadisa) and Tiosulphate-Citrate-Bilis-Sucrose (TCBS, Oxoid) media were counted, and bacteria present in clams were isolated. Abundance of bacteria over time was analyzed at the four geographic localities, and a taxonomic study was performed on the facultative anaerobic bacteria belonging to the genus *Vibrio*. A total of 27 phenotypic tests were performed on clam strains in order to determine their taxonomic position. The results were analysed by numerical taxonomy.

Results of bacterial density data over time indicated a seasonal relationship increasing during warmer temperatures. Values were similar for all locations analysed ranging  $10^5$ - $10^7$  CFU/g of clam tissue in MA and  $10^4$ - $10^6$  CFU/g in TCBS (Fig. 3.2). These values agree with previous reports (Ortigosa *et al.* 1989, Arias *et al.* 1999). The highest incidence of *Vibrio* and total bacteria in clams was registered in the summer and beginning of autumn, as reported in other studies in the Delta del Ebro and in the Mediterranean Sea (Ortigosa *et al.* 1989, Montilla *et al.* 1994,).

The incidence of the species *V. alginolyticus* was higher in the summer, but *V. splendidus* was found to be the dominant species throughout the sampling period. Bacterial diversity was found homogeneous among the four geographic locations. These results are similar to the study performed by Arias *et al.* (1999). They observed a greater incidence of the species *V. alginolyticus* and *V. harveyi* during summer months in bivalves in the Mediterranean Sea, and found *V. splendidus* to be the dominant species throughout the year. However they were not able to relate specific bacterial diversity with any geographic location.

Differences between total bacteria and vibrios also occurred in the summer due to the proliferation of vibrio species, increasing the risk of the bivalve development. It has been well documented that the multiplication of bacteria and mollusc mortality are linked and temperature dependent (Riquelme *et al.* 1995, Lacoste *et al.* 2001). Recent studies have shown that bivalve defences against bacterial pathogens such as vibrios are influenced both by environmental and physiological parameters (Volety *et al.* 1999).

Generally the bacterial density of the organs (hepatopancreas, mantle, gonad and gill) analyzed as well as the extrapalial fluid was similar and temperature dependent. However higher levels of total bacteria and vibrios were observed in the gonad in clams of certain localities (Fig 3.3-3.7). In the presence of pathogenic species this could be important due to the possibility of vertical transmission to the progeny. Therefore this



organ could be considered as a prime target for sampling in the search for bacterial diversity as well as possible pathogens.

A total of 768 *Vibrio* strains were isolated and their phenotypic profiles obtained. Numerical taxonomy was performed based on the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) and grouped the isolates in 32 phena. The phenotypic profiles are shown on Table 3.2. A total of 6 isolates could not be grouped into any phenum. Figure 3.9 illustrates the dendrogram showing the 32 phenum groups including 768 *Vibrio* strains and some *Vibrio* type strains.

A great diversity was observed with dominance of certain species, mainly *V. splendidus* (53.92%). Other predominant species were *V. lentus* (6.4%), *V. alginolyticus* (6.0%), *V. diazotrophicus* (4.7%), *V. aestuarianus* (4.2%) and *V. pelagius* I / *V. superstes* (2.6%) (Figure 3.8). *Vibrio* species composition obtained in Galician clams was similar to the results obtained in other studies (Ortigosa *et al.* 1989, Montilla *et al.* 1994, Pujalte *et al.* 1999, Castro *et al.* 2002).

In the dendrogram, the phenum F1 was composed of 343 isolates and identified as *V. splendidus* biovar I. The phenum was separated into 2 groups with 291 and 52 strains each, as a consequence of variation in the growth at different temperatures and salinities. Species belonging to this group are very similar phenotypically and practically impossible to differentiate by classical characterization. Therefore genetic techniques would be required for a proper identification to species level.

Phenum F2 was identified as *V. splendidus* biovar II with 70 strains, differentiated from phenum F1 in the arginine dihydrolase test. Phenum F3 contained 46 *V. alginolyticus* strains, the position in the dendrogram appeared distant in comparison with the rest of the vibrios due to several unusual characteristics in the genus, such as resistance to the Vibriostatic agent or tolerance to extreme temperatures and salinities. Phenum F4 consisted in 36 isolates belonging to the species *V. diazotrophicus*, close to *V.*

*tasmaniensis* but could be differentiated in the growth at 6% of NaCl and the test arginine dihidrolase.

Phenum 5 presented 32 *V. aestuarianus* strains and phenum F11 identified as *V. lentus* consisted in 49 isolates, both species are phenotypically similar to *V. splendidus* biovar I but could be differentiated in the amylase test and resistance to the Vibriostatic agent, respectively. Phenum F6 grouped a total of 20 strains identified as *V. pelagius* I / *V. superstes*, the limited phenotypic features could not discriminate between these two species and were treated as one phenum. Phenum F7 identified as *V. fluvialis* included 10 strains, and *V. furnisii* (F25) consisted in 3 isolates. Both species are very similar in their phenotypic features and grow in a wide temperature and salinity range, however they could be differentiated in the production of gas which is positive for *V. furnisii*.

Phena F8, F10, F12, F13 and F14 were identified as *V. natriegens* (17 strains), *V. pacinii* (14 strains), *V. tasmaniensis* (10 strains), *A. fischeri* (12 strains) and *V. scophthalmi* (10 strains) respectively. *V. natriegens* and *A. fischeri* could be differentiated in the test lysine decarboxylase; and *V. pacinii* and *V. mytili* in the enzymatic tests gelatinase and amylase, and in the growth at 4°C temperature.

Other phena with less number of isolates were F15, *V. cyclitrophicus* (6 strains), F16, *V. ordalii* (6 strains), F17, *V. harveyi* (6 strains), F18, *V. nereis* (5 strains), F20, *V. tapetis* (4 strains) and F21, *V. pelagius* II (4 strains). The phenotypic profiles of *V. tapetis* and *V. pelagius* II were very similar and were distinguished by the test of gelatinase and growth at 4°C temperature.

Phena with 1 or 2 isolates were: F22, *V. cincinnatiensis* (2 strains), F23, *V. pectenocida* (2 strains), F24, *V. mediterranei* (2 strains), F26, *V. gazogenes* (1 strain), F27, *V. gallicus* (2 strains), F28, *V. agarivorans* (1 strain) and F29, *A. wodanis* (1 strain). The species *V. mediterranei* and *V. gallicus* were phenotypically similar but could be differentiated in the motility and the test lysine decarboxylase. The species *V. agarivorans* and *V. pectenocida*, both in a close position in the dendrogram were differentiated in the test of

amylase and growth in TCBS media, at 4°C temperature and at 0.5% and 8% NaCl concentration.

In the phenotypic analysis a total of 43 strains could not be defined into any species name, indicating the possibility of the presence of new species phenotypically similar to the close clusters in the dendrogram. Phenotypes not identified to species level were F9 (13 strains), F30 (5 strains), F31 (10 strains) and F32 (8 strains).

A great diversity of *Vibrio* species was found in Galician cultured clams of the four localities examined. The phenotypic tests enabled a preliminary identification and grouping of 768 strains. In the next chapter representative strains of each phenum are genetically characterized to be able to clarify their taxonomic positions.

#### **IV. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE AISLADOS DE *Vibrio.***

## 4. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE AISLADOS DE *Vibrio*.

### 4.1. INTRODUCCIÓN.

#### 4.1.1. *Identificación fenotípica vs. identificación genética.*

Una de las principales dificultades en la identificación de vibrios a nivel de especie reside en el elevado número de especies existentes y la falta de claves fenotípicas claras y útiles para diferenciar unas de otras. Por otro lado, existe una variabilidad intraespecífica importante en muchas especies para diferentes características fenotípicas (por lo que sólo se puede dar el dato como positivo o negativo en función del porcentaje de cepas que responden a dicha prueba). Como resultado de todos estos factores hay especies que es imposible distinguir basándose solamente en sus características fenotípicas, como son las relacionadas con *V. splendidus* (Le Roux y col. 2002).

Normalmente los estudios taxonómicos citan sólo algunas características bioquímicas al describir nuevas especies, y comparan sus resultados con datos fenotípicos de especies relacionadas publicados anteriormente. Aunque los ensayos sean los mismos, las condiciones de crecimiento, composición de los medios, procedimiento de inoculación, y condiciones de incubación pueden afectar y variar los resultados finales. Por ejemplo, se han utilizado los sistemas miniaturizados comerciales (API) para obtener datos y éstos, en muchos casos, dan resultados erróneos cuando se comparan con ensayos realizados mediante la metodología convencional (Romalde y Toranzo 1991, Santos y col. 1993). Además, muchos de los sistemas de identificación bioquímica de vibrios son anteriores a la descripción de un número importante de especies, por lo que es cuestionable si estos sistemas son aplicables hoy en día. Recientemente, Noguerola y Blanch (2008) publicaron una clave de características fenotípicas útil para la diferenciación de vibrios incluyendo las últimas nuevas especies descritas.

Es importante mencionar también que en muchos casos las identificaciones fenotípicas no siempre se corresponden con los resultados obtenidos mediante métodos genéticos. Por ejemplo cepas identificadas fenotípicamente como *V. harveyi* mediante Biolog,

fueron re-clasificadas como *V. campbellii* y *V. rotiferianus* mediante AFLP o hibridación DNA-DNA. Realmente *V. harveyi*, *V. campbellii* y *V. rotiferianus* tienen un perfil fenotípico prácticamente indistinguible (Gómez-Gil y col. 2003, 2004). La falta de concordancia entre datos fenotípicos y genéticos también se ha observado en otros géneros como *Aeromonas* (Ørmen y col. 2005).

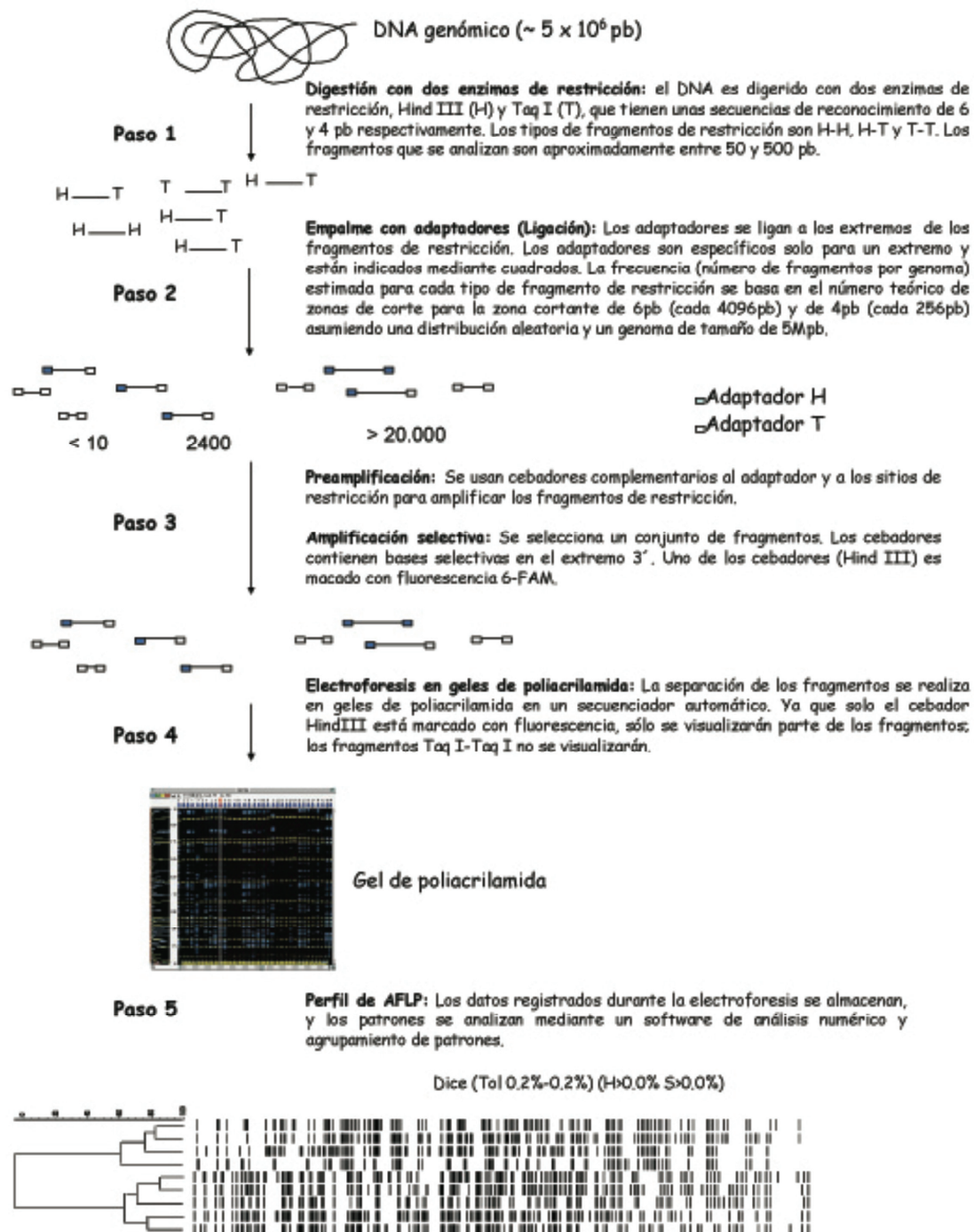
En resumen, los métodos bioquímicos utilizados en el pasado no son, en general, fiables. Parece por tanto necesario, debido a la gran variabilidad intraespecífica en muchas pruebas fenotípicas y a la falta de pruebas claras para diferenciar entre especies, un sistema de clasificación e identificación basado en datos genómicos. En las dos últimas décadas el desarrollo de técnicas moleculares permite la comparación de cepas analizando sus genomas, lo que complementa la información taxonómica aportada por los métodos fenotípicos. Son por todo ello herramientas útiles para la identificación a nivel de especie, el análisis de la diversidad genómica intraespecífica, así como para su aplicación en estudios epidemiológicos que permiten obtener un mayor conocimiento del papel ecológico de estas especies en el medio acuático y su relación con otros organismos.

Diferentes técnicas moleculares han contribuido enormemente al desarrollo de la taxonomía de vibrios. Técnicas basadas en la PCR como la amplificación aleatoria del DNA (RAPD), el estudio de polimorfismos de amplificación del DNA (AFLP) o el análisis de secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (REP) han aportado información de mucho valor para realizar estudios epidemiológicos e identificar cepas dentro de la familia *Vibrionaceae* (Arias y col. 1997, Austin y col. 1997, Jiang y col. 2000, Thompson y col. 2001, 2003c). La aproximación más reciente es la secuenciación del gen 16S rRNA y genes “housekeeping” que han demostrado ser buenos marcadores filogenéticos para una identificación fiable de muchas especies de vibrios (Nhung y col. 2007, Thompson y col. 2004a, 2005, 2007).

**4.1.2. AFLP: Una técnica de tipado molecular.**

La tecnología del AFLP es una combinación de las tecnologías RFLP (polimorfismos en longitud de los fragmentos de restricción) y PCR. Se basa en la amplificación selectiva de los fragmentos de restricción mediante PCR y es un método muy sensible para caracterizar el DNA. La técnica consiste en cinco pasos (Figura 4.1):

1. El DNA es digerido con dos enzimas de restricción diferentes.
2. Se ligan adaptadores oligonucleótidos específicos a los extremos de los fragmentos de restricción.
3. Reacciones de PCR: las secuencias de los adaptadores y zonas de restricción adyacentes sirven como zonas complementarias para los cebadores que amplifican los fragmentos de restricción (Pre-amplificación). En la segunda amplificación se incluyen nucleótidos selectivos en el extremo 3' de los cebadores de PCR para amplificar sólo un conjunto de zonas de restricción. Uno de los cebadores está marcado con fluorescencia.
4. Separación de los productos de PCR mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, se detectan los fragmentos que llevan el cebador marcado con fluorescencia.
5. Se analiza el patrón de bandas mediante programas informáticos específicos (Huys y Swings, 1999; Vos y col. 1995).



**Figura 4.1.** Procedimiento de la técnica de AFLP (modificado de Janssen y col. 1996).



La técnica de AFLP fue descrita por primera vez en 1995 como una técnica para detectar fragmentos de restricción genómicos mediante la amplificación por PCR (Vos y col. 1995). Originalmente se marcaban los cebadores con radioactividad, aunque hoy prácticamente el marcaje se realiza únicamente con fluorescencia. Detecta polimorfismos generados por cambios (de presencia o tamaño) en los sitios de restricción o en los adyacentes a éstos. Aunque no se requiere un conocimiento previo de la secuencia, la combinación de enzimas elegidos afectarán al poder discriminativo y a la resolución genética de la técnica, así que se debe seleccionar una combinación adecuada para cada organismo examinado aumentando así la probabilidad de encontrar polimorfismos útiles. Janssen y col. (1996) sugirieron que para bacterias con el contenido G + C de 40-50%, los enzimas *Hind* III y *Taq* I producen un número de fragmentos de tamaño adecuado y, posteriormente, se utilizaron para analizar 506 cepas de *Vibrio* (Thompson y col. 2001). Huys y col. (1996) sugirieron que un número mayor de polimorfismos de DNA generaría un análisis comparativo más exacto y facilitaría la discriminación entre cepas.

La mayoría de los marcadores de AFLP son de tipo mono-alélico, lo que significa que sólo se podrá registrar un alelo porque su complementario no se detecta. La evaluación directa de bandas específicas es casi imposible debido al elevado número de bandas generado y a que los colorantes fluorescentes no se pueden distinguir a simple vista. Se utilizan por ello programas informáticos.

La técnica de AFLP indica variación en todo el genoma, por tanto se considera que aporta información útil en la evolución de cepas bacterianas a corto y largo plazo (Lan y Reeves 2002). Se ha aplicado a un número considerable de microorganismos demostrando su rapidez, reproducibilidad y capacidad de discriminación (Huys y col. 1996, Rademaker y col. 2000, Duim y col. 2001). Es una técnica de tipado molecular altamente resolutive que se ha utilizado para la identificación de especies, y muestra las relaciones entre cepas a nivel taxonómico y epidemiológico (Arias y col. 1997, Jiang y col. 2000). Además permite la detección de fragmentos de restricción de cualquier origen o complejidad, no requiere información previa de las secuencias ni hay que

generar sondas de hibridación y puede, además, crear mapas genéticos de genomas o de segmentos de genomas. El principal problema es que requiere bastante técnica en el laboratorio y, especialmente, en el análisis de datos.

#### **4.1.3. AFLP: su uso en especies bacterianas.**

La técnica de AFLP ha demostrado ser una herramienta de gran impacto para estudios epidemiológicos (Thyssen y col. 2000, Lan y Reeves 2002, Thompson y col. 2003c), de diversidad genética (Arias y col. 1997, Jiang y col. 2000), y de taxonomía y filogenia de numerosos género bacterianos como *Aeromonas* (Huys y col. 1996), *Xanthomonas* (Rademaker y col. 2000), *Clostridium* (Keto-Timonen y col. 2006), *Campylobacter* (Duim y col. 2001), *Brucella* (Whatmore y col. 2005) y *Vibrio* (Thompson y col. 2001), entre otros. En algunos casos se ha comprobado que los resultados concuerdan con resultados obtenidos por la hibridación DNA-DNA (Huys y col. 1996, Rademaker y col. 2000).

Ripabelli y col. (2003) encontraron una alta diversidad intraespecífica entre cepas de *V. vulnificus* y *V. alginolyticus* aislados a partir de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) mediante las técnicas de AFLP y RAPD, aportando información de gran ayuda para estudios moleculares epidemiológicos y ecológicos. Lan y Reeves (2002) utilizaron los datos generados por AFLP para estudiar la propagación del cólera, discriminaron clones, y propusieron el diseño de cebadores específicos para los fragmentos de AFLP más útiles en la diferenciación de aislados mediante una PCR multiplex. Los análisis realizados por AFLP han producido los mejores datos para el estudio de la evolución del cólera permitiendo un seguimiento de los brotes y su propagación (Jiang y col. 2000, Lan y Reeves 2002, Thompson y col. 2003c). Thyssen y col. (2000) estudiaron la posición taxonómica de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* mediante AFLP y discriminaron entre aislados Japoneses y Mediterráneos, comprobando que la técnica servía para identificar el patógeno y su origen.

Debido al poder discriminativo de ésta técnica, puede utilizarse como un método más de identificación. Más de 34 nuevas especies dentro de la familia *Vibrionaceae* se han

descrito en base a estudios de AFLP (Ben-Haim y col. 2003, Gómez-Gil y col. 2003, 2004, Thompson y col. 2003a, b, c, d, Sawabe y col. 2004a, b, Kumar y Nair 2007).

### **4.1.4. Secuenciación del gen 16S rRNA y genes “housekeeping”.**

El gen 16S rRNA contiene regiones altamente conservadas que permiten establecer la relación taxonómica profunda entre familias, clases y filos, así como regiones variables que posibilitan discriminar entre especies dentro del mismo género. Estas características permitieron utilizar el gen como marcador filogenético y herramienta de identificación. Estudios como el de Dorsh y col. (1992) obtuvieron secuencias del gen 16S rRNA de representantes del género *Vibrio* y comprobaron que los resultados obtenidos eran congruentes con datos de hibridación DNA-DNA. Kita-Tsukamoto y col. (1993) realizaron un estudio filogenético de la familia *Vibrionaceae* mediante secuenciación del gen 16S rRNA y los mayores hallazgos fueron: (i) las cepas de la misma especie tienen una similitud de 99,3% como mínimo en este, una similitud de 95-96% a nivel de género y una similitud de 90-91% a nivel de familia, y (ii) la delineación de 7 grupos principales dentro de *Vibrionaceae*. Posteriormente, Mellado y col. (1996) transfirieron *V. costicola* a *Salinivibrio costicola*; y Urakawa y col. (1998, 1999a) transfirieron *V. marinus* a *Moritella marina* y *V. iliopiscarius* a *Photobacterium iliopiscarius*.

Pero hoy en día, con la cantidad de especies de *Vibrio* descritas, la filogenia basada solamente en el gen 16S rRNA no indica, en muchos casos, la diferencia entre especies muy cercanas; por lo tanto es necesario recurrir a marcadores filogenéticos alternativos. Estos marcadores deben cumplir ciertos criterios propuestos por Zeigler (2003): (i) los genes han de estar distribuidos ampliamente en los genomas, (ii) han de tener una sola copia en el genoma, (iii) la secuencia de cada gen ha de ser suficientemente larga para contener información, pero suficientemente corta para poder secuenciarla (entre 900 y 2250 pb), y (iv) las secuencias han de predecir las relaciones del todo el genoma con una precisión aceptable que se correlacione con el gen 16S rRNA y con la similitud de todo el genoma medido por la hibridación DNA-DNA.

Se ha obtenido una gran correlación mediante la secuenciación de los genes “housekeeping” *rpoA*, *atpA*, *pyrH*, *recA* y *dnaJ* con el gen 16S rRNA (Thompson y col. 2004a, 2005, 2007, Nuhng y col. 2007). Estos estudios polifásicos sugieren su uso como marcadores alternativos de identificación y filogenéticos. Thompson y col. (2006), estudiando las secuencias de los genes 16S rRNA, *rpoA*, *recA* y *pyrH* concatenadas y las correspondientes relaciones filogenéticas, observaron la existencia de agrupaciones de *Vibrio* en diferentes ramas evolutivas, que denominaron en base a una especie tipo (por ejemplo *V. harveyi*, *V. splendidus*). Uno de los grupos era el de *V. fischeri* que más adelante Urbanzyk y col. (2007) reclasificaron como *Aliivibrio*.

La técnica de análisis de secuencias multilocus (MLSA), que estudia variaciones en los genes “housekeeping”, es una herramienta adecuada para estudios de microevolución en bacterias, ya que detecta cambios sinónimos y no sinónimos así como casos de recombinación entre cepas (Feil 2004). Los datos son reproducibles y permiten la creación de bases de datos para identificación de aislados (Urwin y Maiden 2003). Claramente la técnica genera datos claves para delinear especies de *Vibrio*, ofreciendo una alternativa accesible, práctica y fiable a la hibridación DNA-DNA y a la secuenciación del gen 16S rRNA.

#### **4.1.5. ERIC y REP PCR.**

Numerosos estudios se han centrado en la caracterización de secuencias repetitivas intergénicas (Rep) en bacterias entéricas, como *Escherichia coli* o *Salmonella typhimurium* (Stern y col. 1984, Hulton y col. 1991). El estudio de Versalovic y col. (1991) demostró que estas secuencias se encontraban principalmente en bacterias Gram negativas. Las secuencias son altamente conservadas en la evolución del genoma bacteriano. Se dividen principalmente en dos tipos: un tipo consiste en elementos extragénicos palindrómicos (REP) y el otro en secuencias consenso intergénicas repetitivas (ERIC). Ambas comparten algunas características: (i) se sitúan en regiones transcritas no codificantes del cromosoma, (ii) sus localizaciones en el cromosoma varían en distintas especies, (iii) pueden ocurrir en cualquier orientación con respecto a

la transcripción, y (iv) ambas incluyen una repetición invertida conservada. También hay algunas diferencias: (i) las secuencias REP son mucho más cortas (33 pb frente a 126 pb), y (ii) se encuentran copias múltiples de secuencias REP en un punto del cromosoma, mientras que las secuencias ERIC ocurren individualmente. En *Escherichia coli* el número estimado de secuencias REP por cromosoma es diez veces el de secuencias ERIC (Hulton y col. 1991).

No se ha identificado una sola función que explique satisfactoriamente la distribución y conservación de estas secuencias. Parece que están involucradas en la estabilización del RNA mensajero (mRNA), en la expresión de los genes, en la estructura y organización cromosomal, como una posición de unión para proteínas específicas, en la recombinación homóloga y la generación de diversidad genética (Stern y col. 1984, de Bruijn y col. 1992).

El procedimiento de Rep-PCR implica el uso de cebadores basados en las secuencias repetitivas de ERIC y REP. Fue diseñado por Versalovic y col. (1991) para enterobacterias. Posteriormente se han detectado en una amplia variedad de géneros bacterianos (Wong y Lin 2001, Byoung-Kwon y col. 2003, Szczuka y Kaznowski 2004, Malupin y col. 2005, Tacao y col. 2005, Woo y Lee 2006). Se consideró que las técnicas de ERIC y REP-PCR constituirían metodologías útiles para analizar el genoma bacteriano, y poder así distinguir y clasificar cepas y especies (de Bruijn y col. 1992, Bennasar y col. 2000, Byoung-Kwon y col. 2003, Soler y col. 2003, Szczuka y Kaznowski 2004, Tacao y col. 2005, Woo y Lee 2006, Balboa y col. 2007, Mancuso y col. 2007). La amplificación de los elementos repetitivos de DNA se utiliza para obtener patrones de DNA específicos de cada cepa, que se analizan fácilmente mediante un software. La técnica de Rep-PCR posee las ventajas de simplicidad y rapidez frente a otros métodos de tipado molecular como RFLP o electroforesis de campos pulsados (PFGE).

La técnica se ha utilizado para estudiar la variabilidad intraespecífica de especies del género *Vibrio* con fines epidemiológicos (Rivera y col. 1995, Wong y Lin 2001, Malupin y col. 2005, Rodríguez y col. 2006).

En este estudio se evalúa el uso de estas dos técnicas moleculares, ERIC-PCR y REP-PCR para determinar la variación intraespecífica en cepas de *Vibrio* previamente identificadas a nivel de especie mediante la técnica de AFLP.

## **4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **4.2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.**

Para realizar un análisis genómico se seleccionaron un total de 145 aislados del género *Vibrio*, representativos de la mayoría de los grupos fenotípicos obtenidos en el capítulo anterior, con al menos una cepa de cada grupo. De las 145 cepas, 33 se aislaron de Carril, 36 de Redondela, 29 de Vilaboa y 47 de Camariñas. Todas las cepas se cultivaron de forma rutinaria en AM a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 h. Las cepas se conservaron ultracongeladas a  $-80^\circ\text{C}$  en Caldo Marino con glicerol (15% v/v).

### **4.2.2. Extracción del DNA genómico.**

Se obtuvieron células a partir de cultivos puros y se extrajo DNA utilizando el sistema comercial Easy DNA (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se determinó la concentración y pureza del DNA mediante medida de las densidades ópticas a 260 y 280 nm utilizando un espectrofotómetro Spectra Max Plus 384 (MDS Inc). La integridad del DNA se verificó en geles de agarosa al 1% en tampón TAE (0,04 M Tris-Acetato, 1 Mm EDTA, pH 8,0) teñidos con bromuro de etidio (0,5µg /ml). El DNA extraído se mantuvo a  $-20^\circ\text{C}$  hasta nuevo uso.

### **4.2.3. Caracterización genética mediante la técnica de AFLP.**

#### **4.2.3.1. Preparación de muestras.**

##### Etapas de digestión.

La preparación de muestras se realizó siguiendo las instrucciones de Janssen y col. (1996). La muestra de DNA se diluyó para obtener 1 µg de ADN en 26 µl de agua MilliQ estéril. El DNA se cortó mediante los enzimas de restricción *Taq* I (5'TCGA3') y

*Hind* III (5' AAGCTT3') (Amersham Pharmacia Biotech). Primero se realizó el corte con el enzima *Taq* I. A cada muestra se le añadieron 6 µl de mezcla de digestión con los siguientes componentes: 3,2 µl de OnePhorAll (OPA, Amersham Pharmacia Biotech) (10x), 0,16 µl del reactivo de Cleland ditioneitol (DTT, Fermentas) (1,0 M), 0,32 µl albúmina de suero bovino (BSA, Amersham Pharmacia Biotech) (10 mg/ml), 1,5 µl de *Taq*I (10U /µl) y 0,82 µl de agua Milli-Q. Tras incubar a 65°C durante 1 h 30 min, se añadió 1 µl del enzima *Hind* III (15 U/µl) y se incubó a 37°C durante 1 h 30 min.

#### Unión de adaptadores.

En esta reacción los adaptadores de doble hélice se empalman a los fragmentos de restricción mediante la ligasa T4 (Amersham Pharmacia Biotech) para generar una muestra de DNA y amplificarla por PCR. Para ello se preparó una mezcla que contiene por muestra los siguientes componentes: 0,8 µl de OPA (10x), 0,8 µl de ATP (10 Mm), 0,8 µl del adaptador *Hind* III (2 µM), 0,8 µl del adaptador *Taq* I (20 µM), 0,08 µl de BSA (10 mg/ml), 0,16 µl de DTT (0,25 M), 0,17 µl de T4 ligasa (6 U/µl) y 4,39 µl de agua Milli-Q. Las muestras se incubaron a 37°C durante 3 h. En este punto las muestras se congelaron hasta la ejecución del siguiente paso. Las secuencias de los adaptadores se muestran en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1.** Adaptadores y cebadores de PCR utilizados en este estudio.

Adaptadores /Cebadores	Secuencias <sup>a</sup>
Adaptador <i>Hind</i> III:	5'-CTCGATGACTGCGTACC-3'
Adaptador <i>Taq</i> I	5'-GACGATGAGTCCTGAC-3'
H00	5'-GACTGCGTACCAGCTT-3'
T00	5'-CGATGAGTCCTGACCGA-3'
H01-6FAM	5'-GACTGCGTACCAGCTT <u>A</u> -3'
T03	5'-CGATGAGTCCTGACCGAG <u>A</u> -3'

<sup>a</sup> Las bases subrayadas se corresponden con las bases marcadas con fluorescencia.

Precipitación de DNA.

Para la precipitación, a cada muestra de DNA se le añadieron 76 µl de agua Milli-Q, 84 µl de acetato amónico (NH<sub>4</sub>OAc [6 M]) y 200 µl de isopropanol. Se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente se centrifugó durante 15 min a 14000 rpm. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol al 70 % (v/v) (200 µl); se centrifugó de nuevo a 14000 rpm durante 10 min. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar. Por último, el DNA se disolvió en 100 µl de tampón TE (0.1x) (10 Mm Tris, 0,1 Mm EDTA, pH 8,0). El DNA listo para las amplificaciones por PCR se guardó a -20°C.

*4.2.3.2. Reacciones de PCR.*

Amplificación pre-selectiva.

Para la primera PCR se añadieron 0,5 µl del cebador Hexa no selectivo (H00) (1 µM), 0,5 µl del cebador Tetra no selectivo (TOO) (5 µM), y 4 µl de la muestra de DNA. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Gene Amp PCR System 9600 con el siguiente programa:

	<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>
	Desnaturalización inicial	94	2 min
	Desnaturalización	94	20 seg
x 20	Hibridación	56	30 seg
	Elongación	72	2 min

El producto de PCR preselectivo se diluyó 1:20 en tampón TE (0.1) (volumen final 200 µl) y se guardó a -20°C.

Amplificación selectiva.

Para esta reacción de PCR los cebadores son selectivos y contienen una o más bases extra en el extremo 3'. El cebador Tetra tiene una guanina (T03) (5 µM) y el cebador



Hexa una adenina (H01-FAM) (1  $\mu$ M), ambas marcadas con fluorescencia (las secuencias se muestran en la Tabla 4.1). Para cada reacción de PCR se añadieron 0,5  $\mu$ l de cada cebador y 1,5  $\mu$ l del producto de PCR preselectivo diluido. El programa de PCR fue el siguiente:

94°C 2 min  
(94°C, 20 seg) (66°C, 30 seg) (72°C, 2 min) x1  
(94°C, 20 seg) (65°C, 30 seg) (72°C, 2 min) x1  
(94°C, 20 seg) (64°C, 30 seg) (72°C, 2 min) x1  
(94°C, 20 seg) (63°C, 30 seg) (72°C, 2 min) x1  
(94°C, 20 seg) (62°C, 30 seg) (72°C, 2 min) x1  
(94°C, 20 seg) (61°C, 30 seg) (72°C, 2 min) x1  
(94°C, 20 seg) (60°C, 30 seg) (72°C, 2 min) x1  
(94°C, 20 seg) (59°C, 30 seg) (72°C, 2 min) x1  
(94°C, 20 seg) (58°C, 30 seg) (72°C, 2 min) x1  
(94°C, 20 seg) (57°C, 30 seg) (72°C, 2 min) x1  
(94°C, 20 seg) (56°C, 30 seg) (72°C, 2 min) x20  
60°C 30 min

Los productos de la PCR selectiva se mantuvieron a -20°C protegidos de la luz hasta su análisis.

#### *4.2.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida.*

La separación de los productos selectivos de PCR se realizó en geles de poliacrilamida de 36 cm (18 g de urea, 0,5 g de resina, 25 ml de agua Milli-Q estéril y 5,3 ml de acrilamida al 40%) en un secuenciador ABI Prism 377 (Applied Biosystems). Antes de cargar las muestras en el gel, se mezcló 1,0  $\mu$ l del producto selectivo con 2  $\mu$ l del tampón de carga (0,75  $\mu$ l de formamida des-ionizada, 0,25  $\mu$ l de la solución Dextrano azul 50 Mm EDTA, 0,5  $\mu$ l del marcador molecular GeneScan-500 y 0,5  $\mu$ l del marcador

molecular GeneScan-2500) y se desnaturalizó a 95°C durante 3min. Las muestras se mantuvieron a -20°C en un termobloque (Thermomixer comfort, Eppendorf) hasta que se cargaron en el gel (2,3 µl). La electroforesis se realizó a una temperatura de 51°C durante 3 h 30 min, registrándose los datos mediante el software ABI Prism™ Data Collection (Applied Biosystems). El nivel de reproducibilidad se controló incluyendo la cepa *V. alginolyticus* LMG 4409<sup>T</sup> como control positivo en cada ensayo de AFLP.

#### 4.2.2.4. “Tracking” y análisis numérico.

Se realizó el “tracking” y la normalización de los patrones mediante el software GeneScan 3.1 (Applied Biosystems), y el análisis numérico de los fragmentos amplificados entre 50 y 536 pb con el software BioNumerics 4.5 (Applied Maths, Bélgica). Los valores de similitud se calcularon usando el coeficiente de Dice, con una tolerancia en la posición de banda de 0,3% para compensar las imperfecciones técnicas en bandas homólogas. El dendrograma se realizó mediante el algoritmo UPGMA. Los patrones de AFLP se compararon con los perfiles de vibrios en la base de datos de la Colección Belga de Cepas Bacterianas (BCCM/LMG Bacteria Collection). El valor para delimitar la similitud de los clusters de AFLP fue de 63%. Cepas con una similitud mayor que 88% se consideraron clones siguiendo los criterios de Thompson y col. (2001).

#### 4.2.4. Secuenciación de especies no identificadas por AFLP.

##### 4.2.4.1. Selección de especies no identificadas.

De todos los grupos de AFLP no identificados, se seleccionaron los 8 con el mayor número de cepas en busca de posibles nuevas especies. Se escogió una cepa de cada

Oligonucleótido <sup>a</sup>	Secuencia 5' → 3'	Posición <sup>b</sup>
8 (r)	TTACCGCGGCTGCTGGCACG	537-517
3 (r)	GTTGCGCTCGTTGCGGGACT	1109-1090
anti KK (d)	CGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT	517-537
anti 3 (d)	AGTCCCGCAACGAGCGCAAC	1090-1109

cluster y se procedió a un estudio filogenético basado en la amplificación del gen 16S rRNA y 3 genes “housekeeping”.

#### 4.2.4.2. Secuenciación.

##### Secuenciación del gen 16S rRNA.

A partir de cultivos puros se extrajo el DNA genómico mediante la matriz Instagene (Bio-Rad) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El gen 16S rRNA se amplificó por PCR mediante el sistema Ready-To-Go PCR beads (Amersham Pharmacia Biotech), que incluye todos componentes necesarios para la reacción (deoxirribonucleótidos [dNTPs], tampón y Taq polimerasa), excepto los cebadores y el DNA. Se utilizaron los cebadores universales pA (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') y pH (5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3') (Hutson y col. 1993). A cada "bead" se añadieron 1 µl de DNA (500 ng de DNA por reacción), 1 µl de cada cebador (2 pmol) y 22 µl de agua Milli-Q. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: una fase de desnaturalización inicial a 95°C durante 4 min, seguida de 30 ciclos de amplificación consistentes en desnaturalización (95°C, 1 min), hibridación (55°C, 1 min 30 seg) y elongación (72°C, 5 min), y una elongación final a 72°C durante 5 min. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE (0.04M Tris acetato, 1Mm EDTA). Para verificar una banda de amplificación aproximadamente de 1400 pb se utilizó un marcador de peso molecular de 50-2000 pares de bases (Sigma). Los productos de PCR se purificaron mediante el kit QIAquick PCR Purification (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad de DNA se cuantificó en un gel de agarosa al 1% con un marcador de peso molecular y de cuantificación de DNA (Invitrogen). Para las reacciones de secuenciación se utilizaron cebadores correspondientes a las regiones internas conservadas del gen (Tabla 4.2.) y se empleó el kit de secuenciación GenomeLab DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter).

**Tabla 4.2.** Cebadores internos del gen 16S rRNA. <sup>a</sup>(r) cebador reverso, (d) cebador directo, <sup>b</sup>numeración de la posición establecida para el gen 16S rRNA de *Escherichia coli*.

Los productos de secuenciación se analizaron en un Automatic DNA Sequencer (modelo 373A, Applied Biosystems). Para el análisis y correcciones de las secuencias se

Gen	Producto	Cebador	Secuencia 5' → 3'	Posición
<i>rpoA</i>	RNA polimerasa, cadena $\alpha$ (1000 nt)	rpoA-01-F	ATGCAGGGTTCTGTdACAG	1
		rpoA-03-R	GhGGCCArTTTTChArrCGC	951
		rpoA-05-F	GCAGCdCGTGTwGARCarCG	568
		rpoA-06-R	CGyTGyTCwACACGhGCTGC	568
<i>recA</i>	Proteína RecA (1300 nt)	recA-01-F	TGArAArCASrTTyGGTAAAGG	222
		recA-02-R	TCrCCnTlIrIAGC'IrIACC	1040
		recA-03-F	TyGGbGTGATGTTyGGTAACC	767
		recA-04-R	GGGTTACCrAACATCACvCC	769
<i>atpA</i>	Subunidad $\alpha$ de la sintetasa ATP (1322 nt)	atpA-01-F	CTdAATTChACnGAAATyAGyG	37
		atpA-02-F	GCnATGGGbGAATAyTTCCG	760
		atpA-03-R	CGGAArTATTCvCCCATnGC	760
		atpA-04-R	TTACCArGwyTGGGTTC	1554
		atpA-05-R	GChAGhGCdGTACGrATACC	1204
		atpA-06-F	AGCGAwCTrATyAArCarCG	55

utilizó el programa DNASTar Seqman (Lasergene, USA). Las secuencias de especies cercanas se obtuvieron mediante búsqueda en bases de datos mediante los programas BLAST y FASTA. El alineamiento de secuencias y los análisis filogenéticos se realizaron mediante el “software” Mega versión 4.0. Los árboles filogenéticos se obtuvieron por Neighbour-joining (NJ) (Saitou y Nei 1987), las distancias evolutivas se estimaron por el método de Kimura y se calcularon los valores de “bootstrap” con 1000 réplicas mediante el “software” Mega versión 4.0.

#### Genes “housekeeping”: *rpoA*, *recA*, *pyrH* y *atpA*.

La secuenciación de los genes “housekeeping” se realizó mediante los programas de PCR y secuenciación descritos por Thompson y col. (2004a, 2005, 2007), siguiendo la metodología descrita para el gen 16S rRNA. Se secuenciaron fragmentos de los genes *rpoA* (931 pb), *recA* (613 pb a 713 pb) y *atpA* (1322 pb). Las posiciones de los cebadores en los genes se muestran en la Tabla 4.3. Debido a su ausencia en las bases de datos, se obtuvieron las siguientes secuencias para las cepas tipo de algunas especies de vibrios:

- Gen *rpoA*: *V. comitans* LMG 23416<sup>T</sup>, *V. rarus* LMG 23674<sup>T</sup>, *V. inusitatus* LMG 23434<sup>T</sup>, *V. gallicus* LMG 21330<sup>T</sup>, *V. superstes* LMG 21323<sup>T</sup>, *V. gigantis* DSM 18531<sup>T</sup> y *V. crassostreae* LMG 22240<sup>T</sup>.
- Gen *recA*: *V. comitans* LMG 23416<sup>T</sup>, *V. rarus* LMG 23674<sup>T</sup>, *V. inusitatus* LMG 23434<sup>T</sup>, *V. gallicus* LMG 21330<sup>T</sup>, *V. gigantis* DSM 18531<sup>T</sup> y *V. crassostreae* LMG 22240<sup>T</sup>.
- Gen *atpA*: *V. comitans* LMG 23416<sup>T</sup>, *V. rarus* LMG 23674<sup>T</sup>, *V. inusitatus* LMG 23434<sup>T</sup>, *V. superstes* LMG 21323<sup>T</sup>, *V. gigantis* DSM 18531<sup>T</sup> y *V. crassostreae* LMG 22240<sup>T</sup>, *V. lentus* CECT 5110<sup>T</sup>, *Aliivibrio salmonicida* NCMB 2262<sup>T</sup> y *V. nereis* ATCC 25917<sup>T</sup>.

**Tabla 4.3.** Cebadores de amplificación y secuenciación de los genes *rpoA*, *recA* y *atpA* (Thompson y col. 2004a, 2005, 2007).

#### **4.2.5. Tipado molecular mediante ERIC y REP-PCR.**

##### **4.2.5.1 Cepas bacterianas y extracción de DNA.**

Se utilizaron un total de 41 aislados procedentes de los grupos más grandes identificados mediante la técnica de AFLP. Se analizaron un total de 17 cepas identificadas como *V. cyclitrophicus*, 15 *V. splendidus* identificadas en dos clusters diferentes por AFLP, 5 *V. alginolyticus* y 4 *V. diabolicus*.

A partir de cultivos puros, se extrajo el DNA cromosómico con la matriz Instagene (Bio-Rad), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

##### **4.2.5.2. Cebadores y condiciones de amplificación.**

El estudio de la distribución de los elementos ERIC y REP (Hulton y col. 1991, Stern y col. 1984) se realizó utilizando la técnica de PCR mediante el sistema Ready-To-Go

PCR beads (Amersham Pharmacia Biotech). A cada reacción se le añadieron 100 pmoles de cada cebador y 100 ng de DNA, completando hasta 25 µl con agua destilada tri-estéril. Los cebadores específicos para estas secuencias repetitivas, descritos

Método	Cebador	Secuencia	Tm (°C)
ERIC-PCR	ERIC1R	5' ATGTAAGCTCCTGGGATTTCAC3'	65.1
	ERIC2	5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG3'	66.4
REP-PCR	REP1D	5' NNNRCGYCGNCATCMGGC3'	62.5
	REP2D	5' RCGYCTTATCMGGCCTAC3'	55.1

previamente por Versalovic y col. (1991), se incluyen en la Tabla 4.4. Todas las amplificaciones de PCR se realizaron en un termociclador de gradiente de temperaturas (T gradient, Biometra). Los programas de amplificación fueron los siguientes:

**ERIC-PCR:**

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	95	5 min
x 35	Desnaturalización	92
	Hibridación	52
	Elongación	70
Elongación final	70	10 min

**REP-PCR:**

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	95	7 min
x 35	Desnaturalización	92
	Hibridación	40
	Elongación	72
Elongación final	72	15 min

Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 2% (p/v) con tampón TAE, teñidos con bromuro de etidio (2 µg/ml) y se visualizaron con un transiluminador ultravioleta. Se incluyó en cada gel un marcador de peso molecular de 50-2000 pb (Sigma).

**Tabla 4.4.** Cebadores de ERIC y REP-PCR utilizados en este estudio. A: adenina, T: timina, G: guanina, C: citosina, M: adenina o citosina, R: adenina o guanina, Y: citosina o timina, N: cualquier nucleótido, Tm: máxima temperatura.

#### 4.2.4.3. Análisis de datos.

Las imágenes de los geles se escanearon y se capturaron mediante el sistema Gel Doc-2000 (Bio-Rad). Para el análisis y comparación de los patrones se utilizó el software Diversity Database (Bio-Rad), las similitudes de los aislados se estimaron mediante el coeficiente de Dice y los dendrogramas se realizaron mediante el algoritmo UPGMA.

### 4.3. RESULTADOS.

#### 4.3.1. Identificación de especies de *Vibrio* mediante la técnica de AFLP.

En el estudio de AFLP, además de los patrones de las 145 cepas aisladas de almeja, se incorporaron 544 correspondientes a cepas de referencia de prácticamente todas las especies del género *Vibrio*, previamente analizados en el trabajo de Thompson y col. (2001). El anexo I incluye el listado completo. En el anexo II se muestran los patrones de banda de los aislados de almeja y de algunas cepas de referencia. Los patrones de AFLP tenían entre 65 y 156 bandas de tamaño entre 50 y 536 pb. No se observó la presencia de clones en ningún cluster, ya que los valores de similitud de AFLP fueron inferiores al 88%. La similitud de los patrones obtenidos para *V. alginolyticus* LMG 4409<sup>T</sup> fue siempre superior al 88%, verificando el valor para detectar clones, así como

su función como control positivo. En el análisis de AFLP se obtuvieron un total de 94 clusters y 81 cepas aisladas que se pueden observar el dendrograma de la Figura 4.2.

De las 145 cepas de almeja analizadas, un total de 57 aislados (39,3%) se identificaron a nivel de especie distribuyéndose en 13 clusters. Las especies identificadas fueron *V. cyclitrophicus* (17 cepas), *V. splendidus* (15 cepas en dos clusters distintos), *V. alginolyticus* (5 cepas), *V. diabolicus* (4 cepas), *V. crassostreae* (4 cepas), *V. chagasii* (3 cepas), *V. mediterranei* (2 cepas), *V. ichthyenteri* (1 cepa), *V. parahaemolyticus* (1 cepa), *V. pectenecida* (1 cepa) y *V. lentus* (1 cepa). La mayoría de las cepas, un total de 88 (60,7%), no pudieron ser identificadas a nivel de especie y se distribuyeron en 16 clusters (59 cepas) y 29 cepas aisladas.

#### **4.3.2. Comparación de la identificación fenotípica y genética.**

La Tabla 4.5 ilustra de una forma esquemática la comparación de los resultados obtenidos por AFLP y por métodos fenotípicos. En el anexo III se enumeran las cepas aisladas de almeja, con su lugar de aislamiento y sus identificaciones mediante AFLP y por métodos fenotípicos. Se observa una escasa coincidencia en las identificaciones realizadas por métodos fenotípicos y genéticos (29.82%). Se obtuvo una diversidad mucho mayor en los resultados obtenidos por AFLP. Por ejemplo, los aislados identificados como *V. splendidus* basándose en resultados fenotípicos, mediante AFLP fueron identificados como *V. cyclitrophicus*, *V. chagasii* o no fueron identificados. Los aislados identificados fenotípicamente como *V. aestuarianus*, por AFLP se identificaron como *V. lentus*, *V. cyclitrophicus* o *V. diabolicus*; o los aislados de *V. harveyi* / *V. vulnificus* (datos fenotípicos), por AFLP fueron identificados como *V. crassostreae*, *V. diabolicus*, *V. parahaemolyticus* o *V. mediterranei*.

#### **4.3.3. Análisis filogenético y posiciones taxonómicas de cepas no identificadas por AFLP.**

Los clusters de cepas no identificadas con mayor número de aislados fueron el 70 (9 cepas), 37 (7 cepas), 5 (6 cepas), 9 (5 cepas), 26 y 86 (ambos con 4 cepas), y 16 y 48 (3



aislados en cada uno de ellos). La secuenciación del gen 16S rRNA de cepas representativas de estos grupos confirmaron su pertenencia a la familia *Vibrionaceae*.

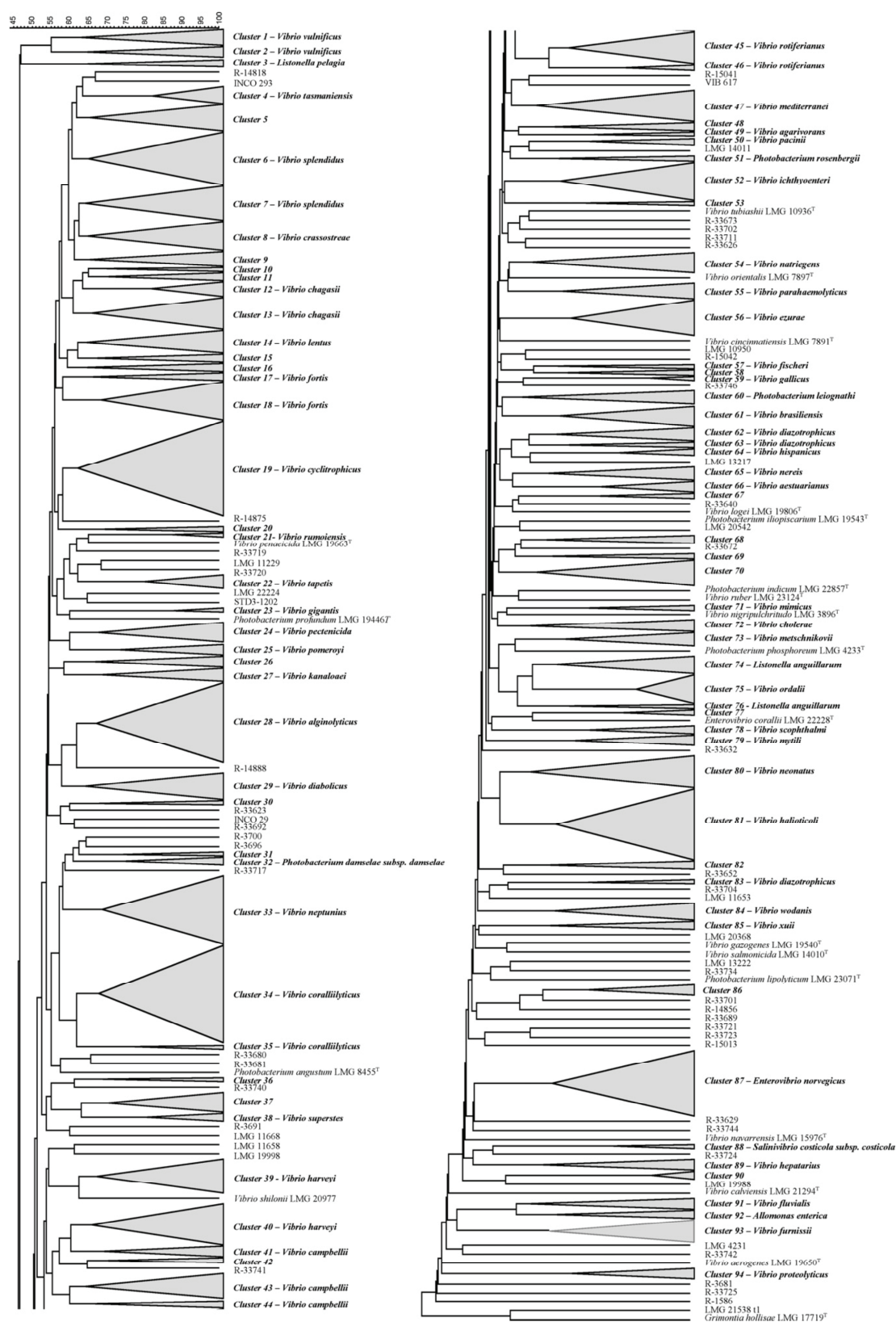
Los resultados de los análisis filogenéticos basados en los genes 16S rRNA, *rpoA*, *recA* y *atpA* concuerdan (Fig. 4.3, 4.4, 4.5 y 4.6), e indican que los clusters 37, 48 y 86 constituyen potencialmente tres nuevas especies que se estudian más en profundidad en el siguiente capítulo. La cepa RD 15.11 del cluster 37 se sitúa con las especies tipo *V. haliotocoli*, con valores de similitud en el gen 16S rRNA de 99,4% con *V. comitans*, 99,1% con *V. rarus* y 99,0% con *V. inusitatus*. La cepa VB 8.9 del cluster 48 se sitúa cerca de las especies *V. splendidus*-like, con valores de similitud en el gen 16S rRNA de 97,6% con *V. splendidus*, 97,3% con *V. gigantis* y 97,1% con *V. pomeroyi*. En todos los árboles aparece en una rama filogenética independiente del resto de las especies más cercanas. La cepa CMJ 11.1 (R33755) del cluster 86 se sitúa con las especies de *Aliivibrio* con valores de similitud en el gen 16S rRNA de 98,1% con *A. wodanis*, 97,0% con *A. fischeri* y *A. logei* y 96,0% con *A. salmonicida*. La Tabla 4.6 muestra los porcentajes de similitud en los genes 16S rRNA, *recA*, *rpoA* y *atpA* de estas tres cepas con respecto a los vibrios más cercanos.

El resto de los aislados de otros clusters aparecen en el grupo *V. splendidus*-like. Los porcentajes de similitud de las cepas secuenciadas con vibrios dentro del clado de *V. splendidus* se observan en la Tabla 4.7. Los porcentajes de similitud más bajos en los genes 16S rRNA y *recA* son claramente con *V. chagasii*. El aislado RD 8.15 comparte un 100% de homología en el gen 16S rRNA con *V. gigantis* y un 99,8% en el gen *rpoA*; pero los mayores porcentajes en el gen *recA* son con *V. kanaloae* (97,1%) y *V. crassostreae* (95,9%).

Los aislados VB 11.8 y VB 10.8 tienen altos valores de similitud en los genes 16S rRNA y *recA* con *V. gigantis* y *V. crassostreae*, pero en el gen *rpoA* los mayores son con las especies *V. pomeroyi* y *V. chagasii*, y en el *atpA* con *V. lentus*, *V. pomeroyi* y *V. splendidus*.

En el caso de las cepas VB 11.11 y RD 9.17 los mayores porcentajes en el gen 16S rRNA son con *V. kanaloae* y *V. tasmaniensis* (99,6-99,8%). Las especies más similares en los genes *recA* y *atpA* concuerdan en la cepa VB 11.11; pero para la cepa RD 9.17 son *V. lentus* (98,7% para el gen *recA* y 99,4% para el gen *atpA*) y *V. splendidus* (97,3% para el gen *recA* y 99,2% para el gen *atpA*). Se observa que las similitudes de las cepas estudiadas y las especies del grupo *V. splendidus* son menores en las secuencias del gen *recA* que en el resto de los genes.

Al realizar un árbol concatenado de tres genes (16S, *rpoA* y *recA*) las posiciones de los vibrios no identificados se mantienen (Figura 4.7) obteniendo unas posiciones taxonómicas más claras.



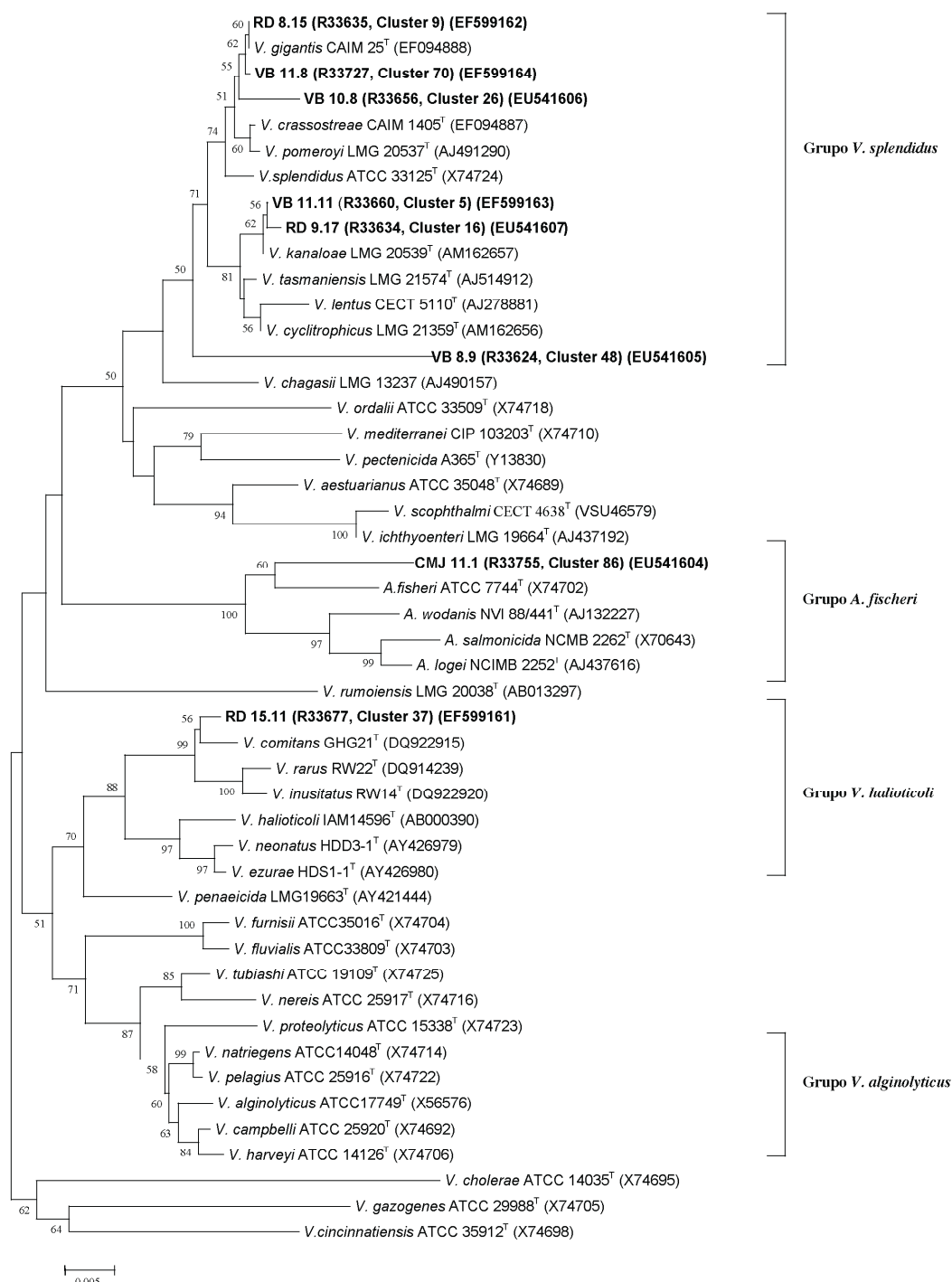
**Figura 4.2.** Dendrograma generado a partir los clusters de AFLP de los 145 vibrios aislados de almeja con 544 cepas de referencia de la familia *Vibrionaceae*.

**Tabla 4.5.** Datos de los resultados preliminares fenotípicos e identificación por AFLP. NT, datos no ensayados; A, Carril; B, Redondela; C, Vilaboa; D, Camariñas; <sub>RP</sub>= *Ruditapes philippinarum*, <sub>RD</sub>= *Ruditapes decussatus*.

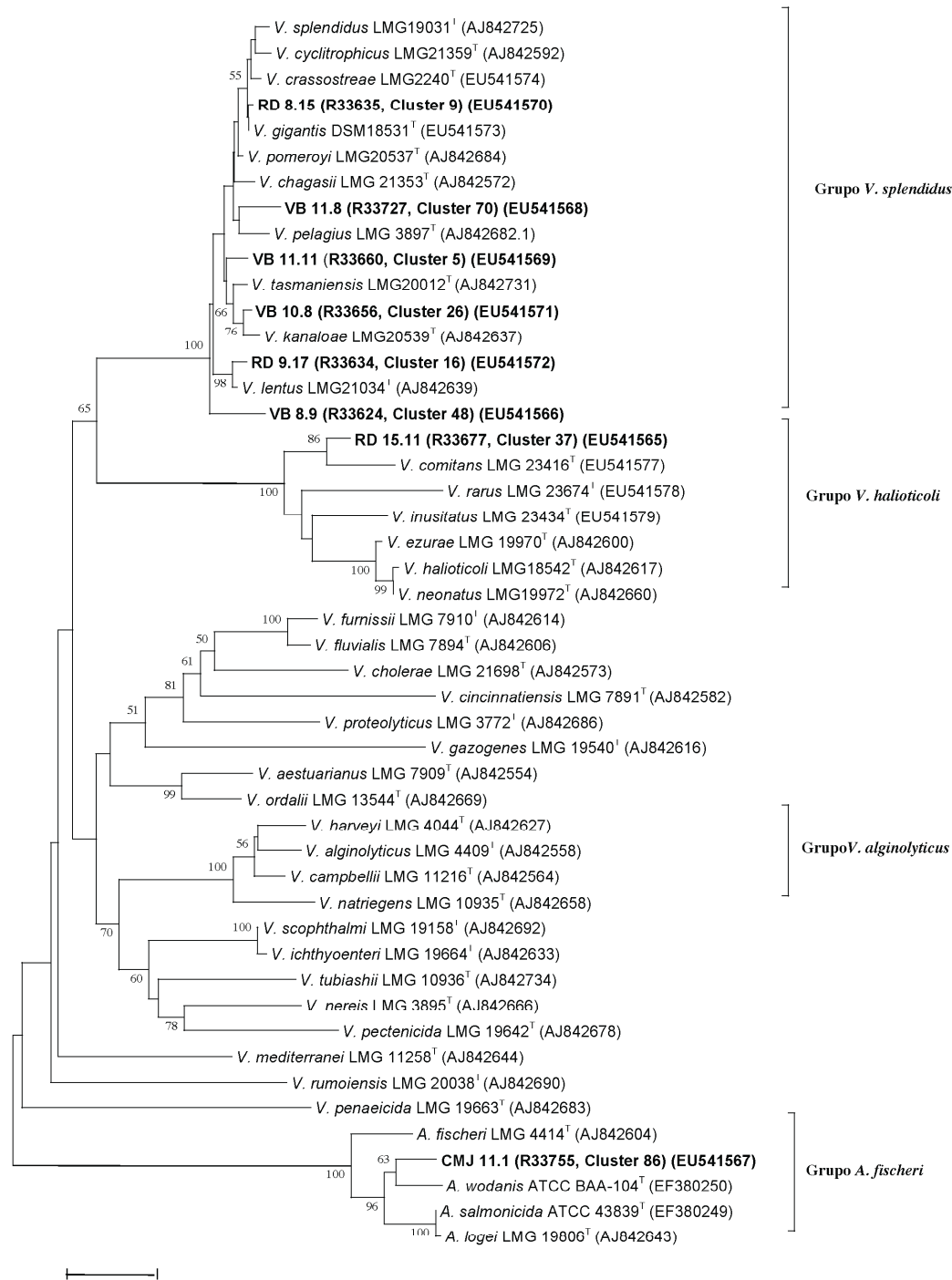
G r u p o fenotípico	Clusters de AFLP	Identificación fenotípica	Identificación por AFLP	Zonas geográficas
P1	5, 6, 7, 9, 13, 19, 48, 68, 77, 26	<i>V. splendidus I</i>	<i>V. splendidus</i> , <i>V. chagasii</i> , <i>V. cyclitrophicus</i> , no identificados	A, B, C, <sub>DRP</sub> , <sub>DRD</sub>
P2	5, 7, 8, 9, 13, 16, 19, 48	<i>V. splendidus II</i>	<i>V. splendidus</i> , <i>V. crassostreae</i> , <i>V. chagasii</i> , <i>V. cyclitrophicus</i> , no identificados	A, B, C, <sub>DRP</sub> , <sub>DRD</sub>
P3	28, 29	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. diabolicus</i>	A, B, C, <sub>DRP</sub> , <sub>DRD</sub>
P4	7, 8, 19, 68, 70	<i>V. diazotrophicus</i>	<i>V. splendidus</i> , <i>V. crassostreae</i> , <i>V. cyclitrophicus</i> , no identificados	A, B, C, <sub>DRP</sub> , <sub>DRD</sub>
P5	5, 14, 19, 29	<i>V. aestuarianus</i>	<i>V. lentus</i> , <i>V. cyclitrophicus</i> , <i>V.</i> <i>diabolicus</i> , no identificados	A, B, C, <sub>DRP</sub>
P6	36, 37, 53, 67, 70	<i>V. pelagius I / V.</i> <i>superstes</i>	No identificados	A, B, C, <sub>DRP</sub> , <sub>DRD</sub>
P7	6, 7, 9, 16, 26	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. splendidus</i> , no identificados	A, B, C, <sub>DRP</sub> , <sub>DRD</sub>
P8	5, 37	<i>V. natriegens</i>	No identificados	A, B, C, <sub>DRP</sub>
P9	28, 53	<i>Vibrio sp.</i>	<i>V. alginolyticus</i> , no identificados	A, B, C, <sub>DRP</sub> , <sub>DRD</sub>
P10	9, 19, 26, 70, 82	<i>V. pacinii</i>	<i>V. cyclitrophicus</i> , no identificados	A, B, C, <sub>DRP</sub> , <sub>DRD</sub>
P11	13, 16, 19	<i>V. lentus</i>	<i>V. chagasii</i> , no identificados	A, B, C, <sub>DRP</sub> , <sub>DRD</sub>
P12	22, 48, 70	<i>V. tasmaniensis / V.</i> <i>fortis</i>	<i>V. tapetis</i> , no identificados	A, B, C, <sub>DRD</sub>
P13	28, 58	<i>V. fischeri / V. logei</i>	<i>V. alginolyticus</i> , no identificados	A, B, C, <sub>DRD</sub>
P14	70, 82	<i>V. scopthalmi</i>	No identificados	A, B, C, <sub>DRP</sub> , <sub>DRD</sub>
P15	8, 19	<i>V. cyclitrophicus</i>	<i>V. cyclitrophicus</i> , <i>V. crassostreae</i>	A, B, C, <sub>DRP</sub> , <sub>DRD</sub>
P16	52	<i>V. ordalii</i>	<i>V. ichthyoenteri</i>	B, C
P17	8, 29, 47, 55	<i>V. harveyi / V. vulnificus</i>	<i>V. crassostreae</i> , <i>V. diabolicus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V.</i> <i>mediterranei</i>	A, B, C
P18	19, 24	<i>V. nereis</i>	<i>V. cyclitrophicus</i> , <i>V. pectenica</i>	A, B, C, <sub>DRP</sub>
P19	19, 77	<i>V. mytili</i>	<i>V. cyclitrophicus</i> , no identificados	B, <sub>DRD</sub>
P20	22	<i>V. tapetis</i>	<i>V. tapetis</i>	A, <sub>DRP</sub>
P21	19, 69, 82	<i>V. pelagius II</i>	<i>V. cyclitrophicus</i> , no identificados	B, <sub>DRD</sub>
P22	37	<i>V. cincinnatiensis</i>	No identificados	B, <sub>DRP</sub> , <sub>DRD</sub>
P23	37	<i>V. pectenica</i>	No identificados	B, <sub>DRP</sub>
P24	6, 47	<i>V. mediterranei</i>	<i>V. mediterranei</i> , <i>V. splendidus</i>	A, C, <sub>DRP</sub>
P25	NT	<i>V. furnisii</i>	NT	B
P26	NT	<i>V. gazogenes</i>	NT	C
P27	Sin cluster	<i>V. gallicus</i>	No identificados	<sub>DRD</sub>
P28	Sin cluster	<i>V. agarivorans</i>	No identificados	A
P29	9	<i>A. wodanis</i>	No identificados	B

**Tabla 4.6.** Porcentajes de similitud en el gen 16S rRNA y tres genes “housekeeping” de las posibles nuevas especies de vibrio (clusters 37, 48 y 86) con las cepas tipo de las especies más próximas.

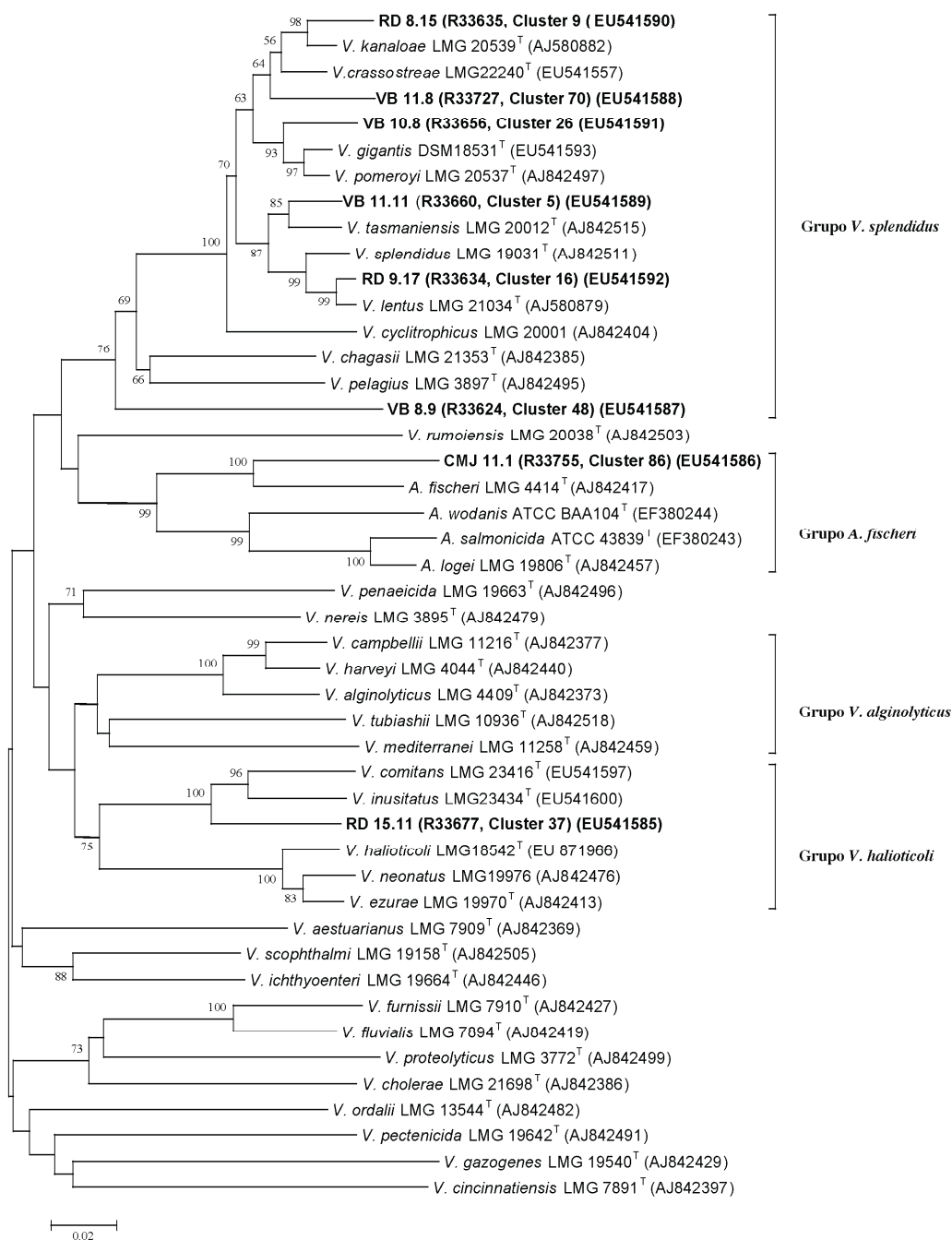
Especie	RD 15.11 (Cluster 37)				VB 8.9 (Cluster 48)				CMJ 11.1 (Cluster 86)			
	16S	recA	rpoA	atpA	16S	recA	rpoA	atpA	16S	recA	rpoA	atpA
<i>V. comitans</i>	99,4	93,0	99,8	97,4	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. rarus</i>	99,1	84,0	94,0	93,0	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. inusitatus</i>	99,0	91,0	96,0	97,1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. splendidus</i>	-	-	-	-	97,6	86,5	97,8	97,1	-	-	-	-
<i>V. gigantis</i>	-	-	-	-	97,3	86,0	97,0	97,9	-	-	-	-
<i>V. pomeroyi</i>	-	-	-	-	97,1	86,0	97,8	97,3	-	-	-	-
<i>A. wodanis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	98,1	82,0	98,1	95,2
<i>A. fischeri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	97,1	89,0	97,2	93,8
<i>A. logei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	97,8	82,0	97,4	95,0
<i>A. salmonicida</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	96,0	81,0	97,5	92,0



**Figura 4.3.** Árbol filogenético construido con secuencias del gen 16S rRNA de 48 cepas de vibrio. La longitud de las ramas horizontales es proporcional a la divergencia evolutiva. Los valores de “bootstrap” (>50%) de 1000 réplicas aparecen próximos a la rama correspondiente. Los códigos de acceso en el GeneBank aparecen entre paréntesis.

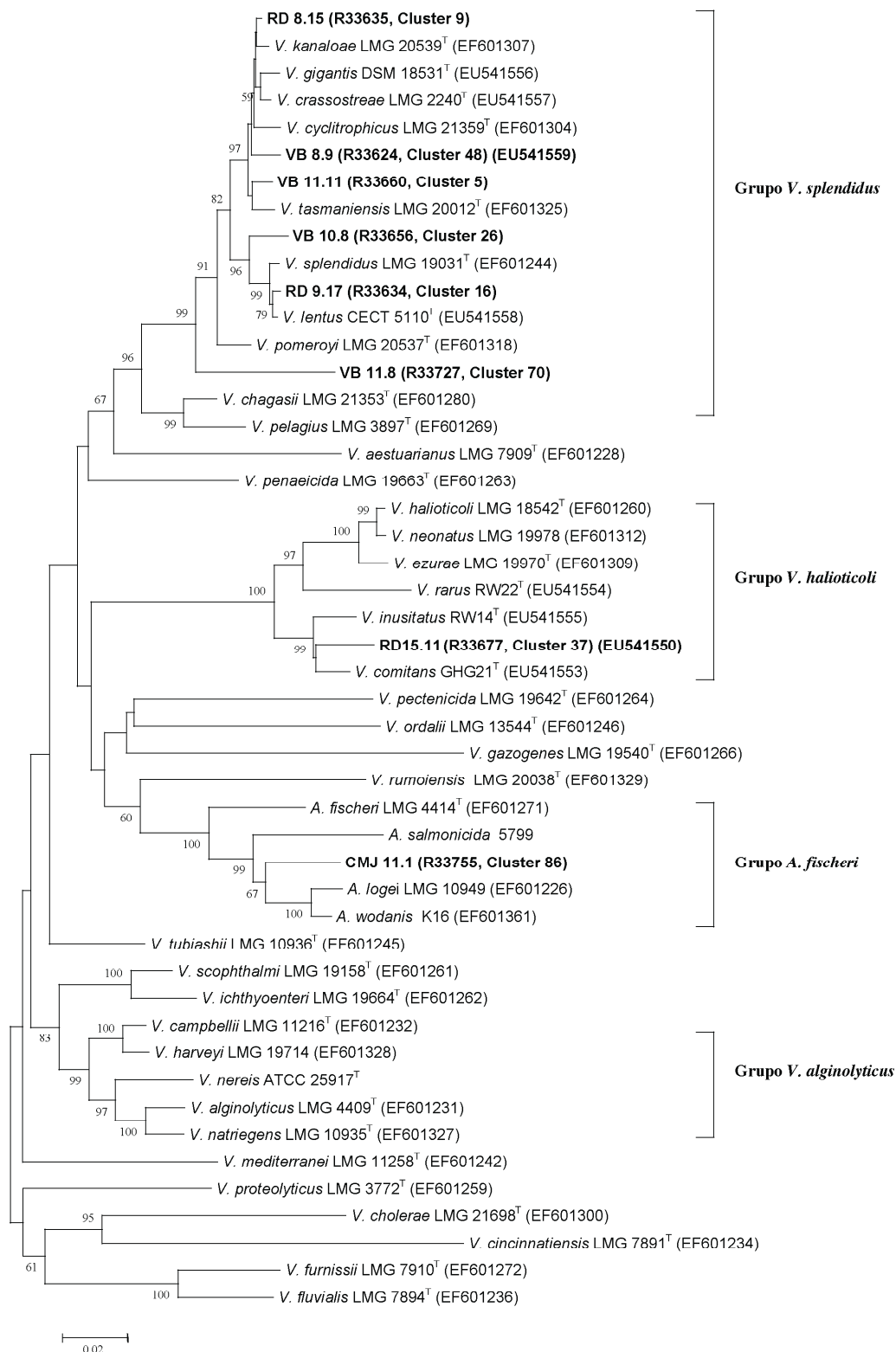


**Figura 4.4.** Árbol filogenético construido con secuencias del gen *rpoA* de 48 cepas de vibrio. Características igual que en la figura 4.3.



**Figura 4.5.** Árbol filogenético construido con secuencias del gen *recA* de 48 cepas de vibrio. Características igual que en la figura 4.3.





**Figura 4.6.** Árbol filogenético construido con secuencias del gen *atpA* de 48 cepas de vibrio. Características igual que en la figura 4.3.

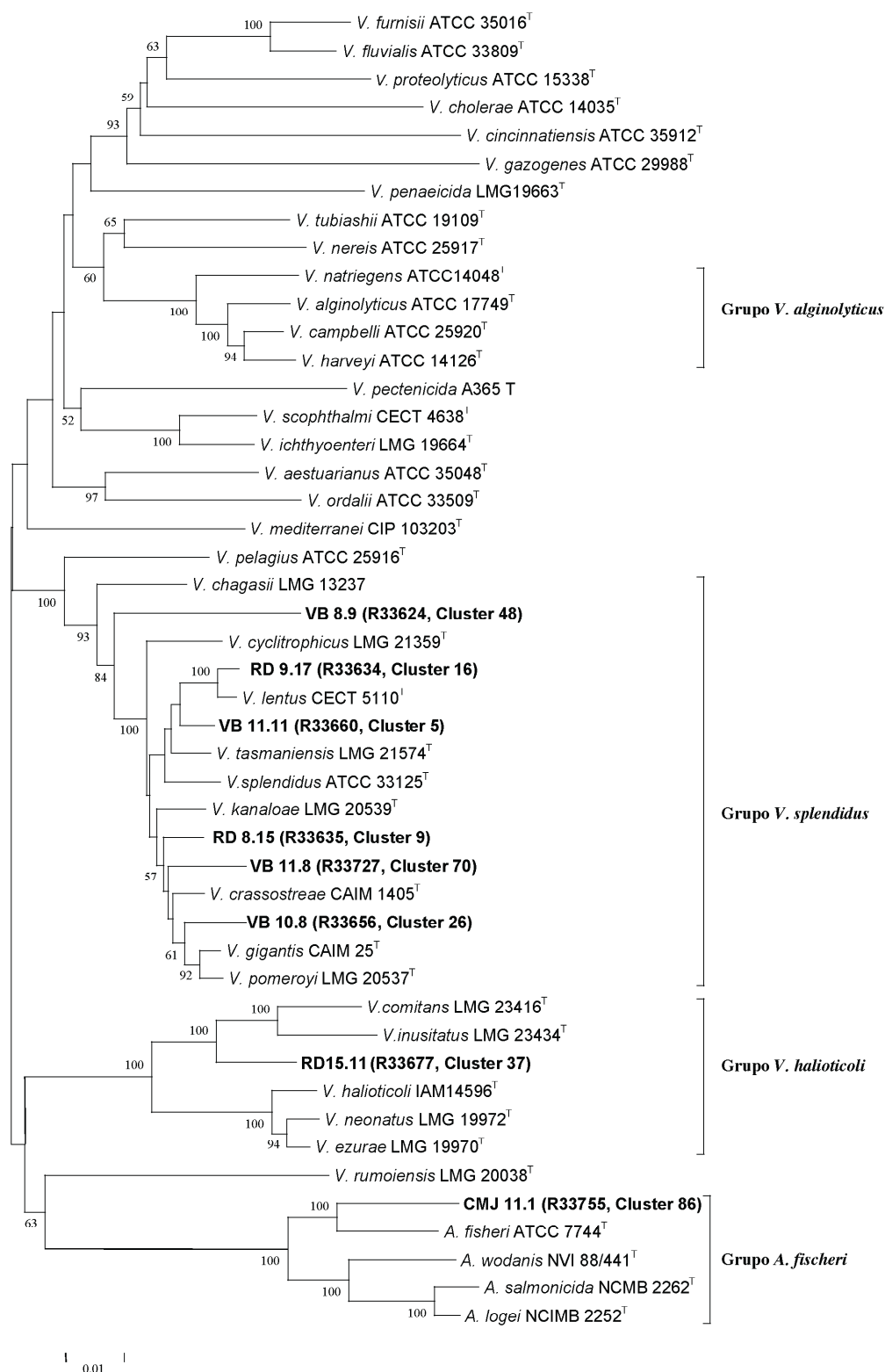


Figura 4.7. Árbol filogenético construido con secuencias concatenadas de los genes 16S rRNA, recA y rpoA de 48 cepas de *Vibrio*. Características igual que en la figura 4.3.

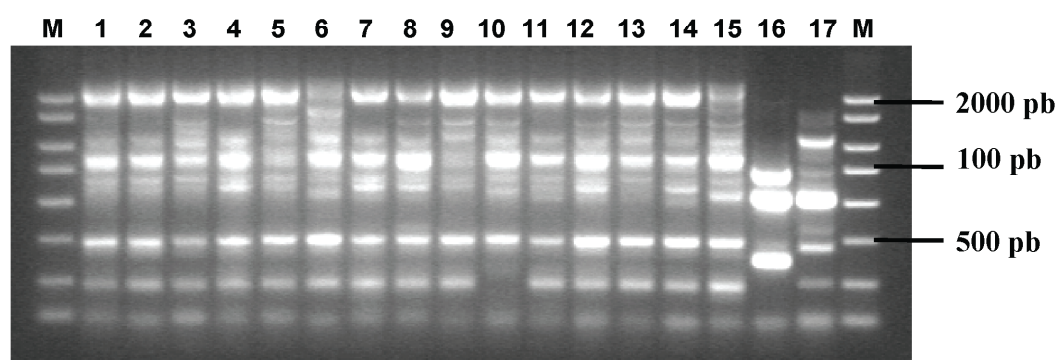


#### 4.3.4. Análisis por ERIC y REP-PCR de las especies de *Vibrio* predominantes.

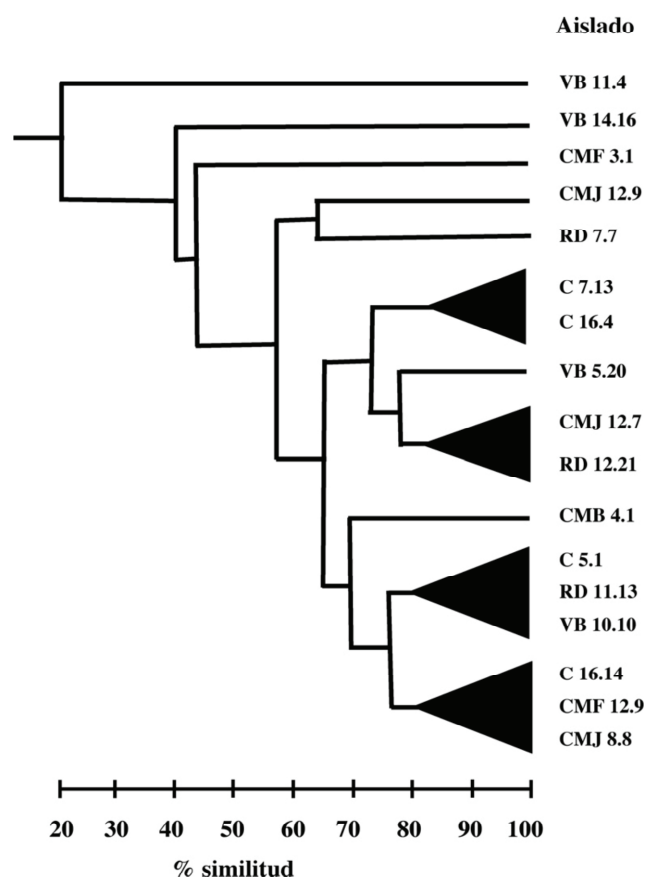
##### 4.3.4.1. *V. cyclitrophicus*.

Con las técnicas de REP y ERIC-PCR se obtuvieron patrones de 4 a 8 bandas entre 150 y 2000 pb, dependiendo de la técnica y del aislado. En el caso de REP-PCR se obtuvieron 11 perfiles genéticos. Se formaron 4 clusters, con 2 y 3 cepas, con porcentajes de similitud superiores al 80% (Figuras 4.7 y 4.8). El resto de los perfiles fueron específicos para cada cepa. Los perfiles de las cepas VB 11.4 y VB 14.16 son los más diferentes con valores de similitud con el resto de las cepas de 40 y 25%, respectivamente (Figuras 4.7 y 4.8).

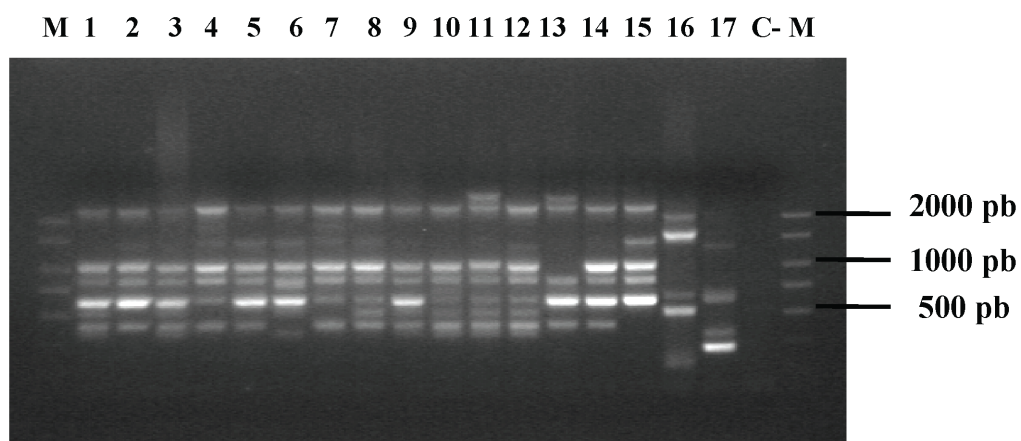
Se observa una mayor diversidad con la técnica de ERIC-PCR. Se obtuvieron 7 perfiles genéticos; los mayoritarios, I, II y III, con 6, 5 y 2 aislados respectivamente, y cuatro minoritarios, IV, V, VI y VII, con una sola cepa (Figura 4.9). Los aislados del cluster I poseen valores de homología entre ellos superiores al 68%, en el cluster II superiores al 71% y en el cluster III superiores al 60% (Fig. 4.10). Al igual que sucede en REP, los perfiles de los aislados VB 11.4 y VB 14.16 son claramente los más diferenciados (Figuras 4.9 y 4.10).



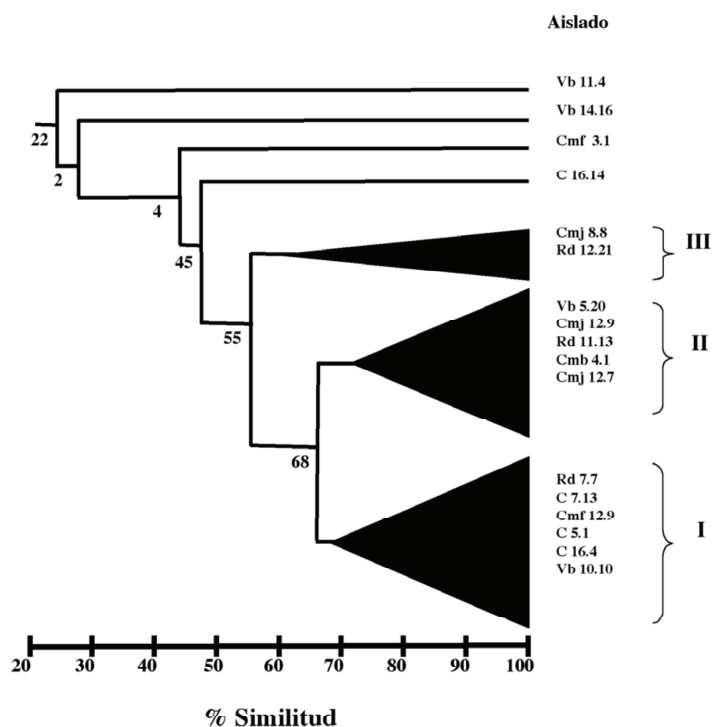
**Figura 4.7.** Patrones de REP-PCR de 17 aislados de *V. cyclitrophicus*. M, marcador de peso molecular (50-2000 pb; Sigma); **1**, C 5.1; **2**, VB 10.10; **3**, CMF 12.9; **4**, RD 11.13; **5**, C 7.13; **6**, RD 7.7; **7**, VB 5.20; **8**, CMJ 12.7; **9**, C 16.4; **10**, CMB 4.1; **11**, CMJ 12.9; **12**, CMJ 8.8; **13**, CMF 3.1; **14**, RD 12.21; **15**, C 16.14; **16**, VB 11.4; **17**, VB 14.16.



**Figura 4.8.** Dendrograma de similitud entre perfiles de REP de *V. cyclitrophicus*, obtenido mediante el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA.



**Figura 4.9.** Patrones de ERIC-PCR de 17 aislados de *V. cyclitrophicus*. M, marcador de peso molecular (50-2000 pb; Sigma); 1, C 5.1; 2, VB 10.10; 3, CMF 12.9; 4, RD 11.13; 5, C 7.13; 6, RD 7.7; 7, VB 5.20; 8, CMJ 12.7; 9, C 16.4; 10, CMB 4.1; 11, CMJ 12.9; 12, CMJ 8.8; 13, CMF 3.1; 14, RD 12.21; 15, C 16.14; 16, VB 11.4; 17, VB 14.16.



**Figura 4.10.** Dendrograma de similitud entre perfiles de ERIC de *V. cyclitrophicus*, obtenido mediante el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA.

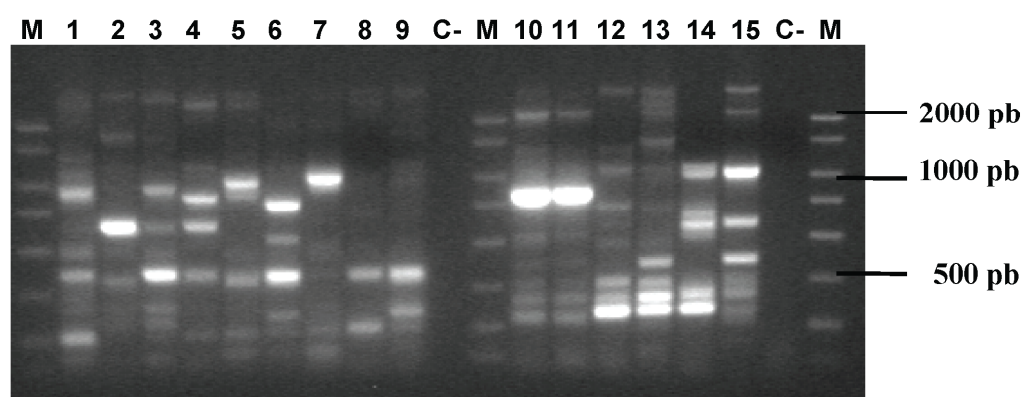
#### 4.3.4.2. *V. splendidus*

Según el análisis de AFLP, los 15 aislados de *V. splendidus* se dividieron en dos clusters, cluster 6 (9 cepas) y cluster 7 (6 cepas). Cuando se aplicaron a estos aislados las técnicas de ERIC- y REP-PCR se observó una elevada heterogeneidad entre ellos.

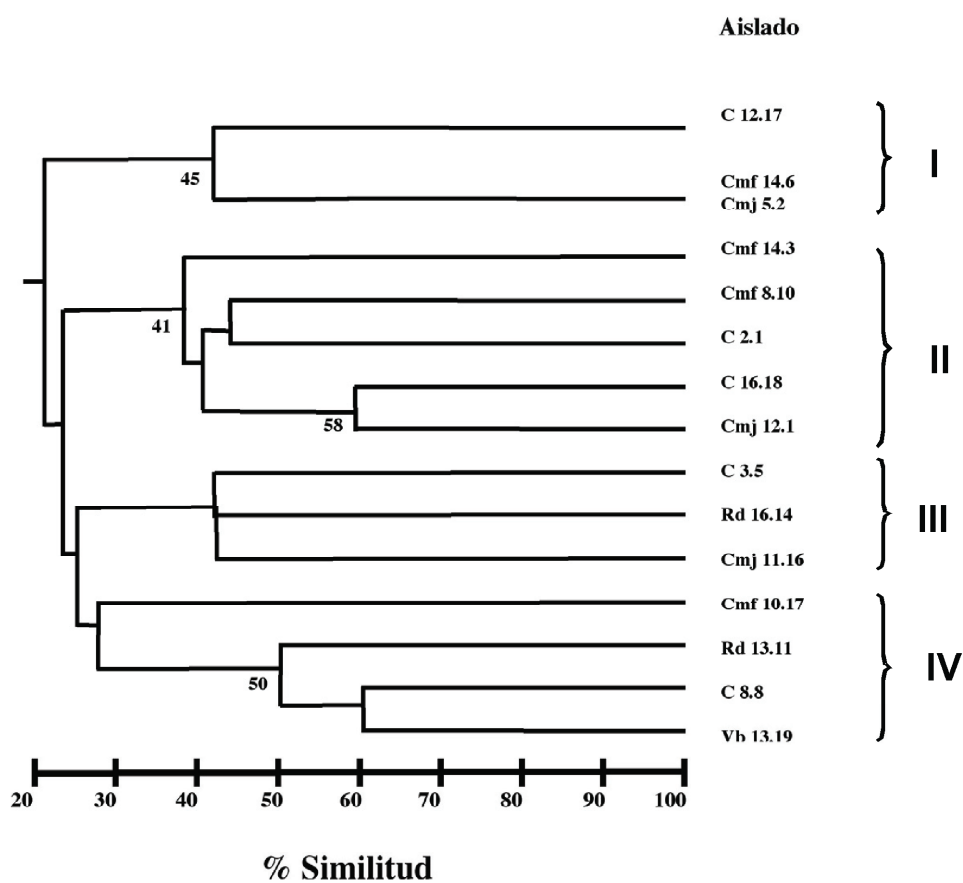
Los patrones de amplificación en ERIC- y REP-PCR estuvieron constituidos por 5 a 11 bandas con pesos moleculares entre 150 y 2000 pb. Según los resultados de REP las cepas se distribuyeron en 4 grupos, tres de ellos con porcentajes de similitud mayores que el 40% y uno mayor que el 25%. Sólo las cepas CMF 14.6 y CMJ 5.2 presentaron un 100% de homología.

Los aislados de los grupos I y II pertenecen al cluster 7 de AFLP excepto las cepas C 12.17 y C 2.1, las cepas de los grupos III y IV pertenecen todas al cluster 6 de AFLP (Figuras 4.11 y 4.12).

Los patrones de ERIC-PCR fueron específicos para cada cepa excepto las cepas CMF 14.6 y CMJ 5.2 que se agruparon con porcentajes de similitud del 88.5%. Se formaron 3 grandes grupos con porcentajes de similitud >30%. Los grupos I y III están formados por cepas ambos clusters de AFLP, mientras que las cepas del grupo II pertenecen al cluster 6 de AFLP (Figuras 4.13 y 4.14).

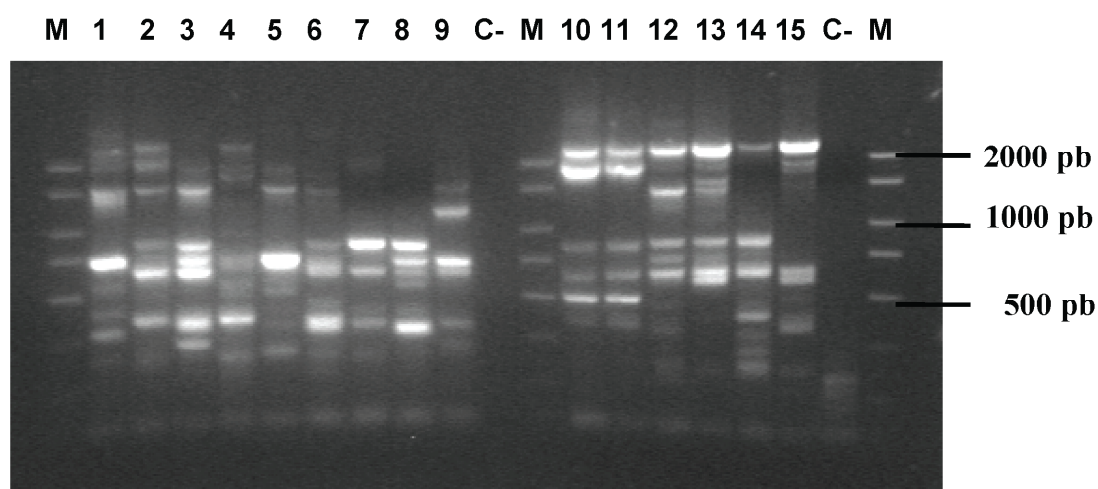


**Figura 4.11.** Patrones de REP-PCR de 15 aislados de *V. splendidus*. M, marcador de peso molecular (50-2000 pb; Sigma); **1**, RD 13.22; **2**, VB 13.19; **3**, C 12.17; **4**, C 3.5; **5**, CMF 10.17; **6**, C 8.8; **7**, C 2.1; **8**, CMJ 11.16; **9**, RD 16.14; **10**, CMF 14.6; **11**, CMJ 5.2; **12**, C 16.18; **13**, CMF 8.10; **14**, CMJ 12.1; **15**, CMF 14.3.

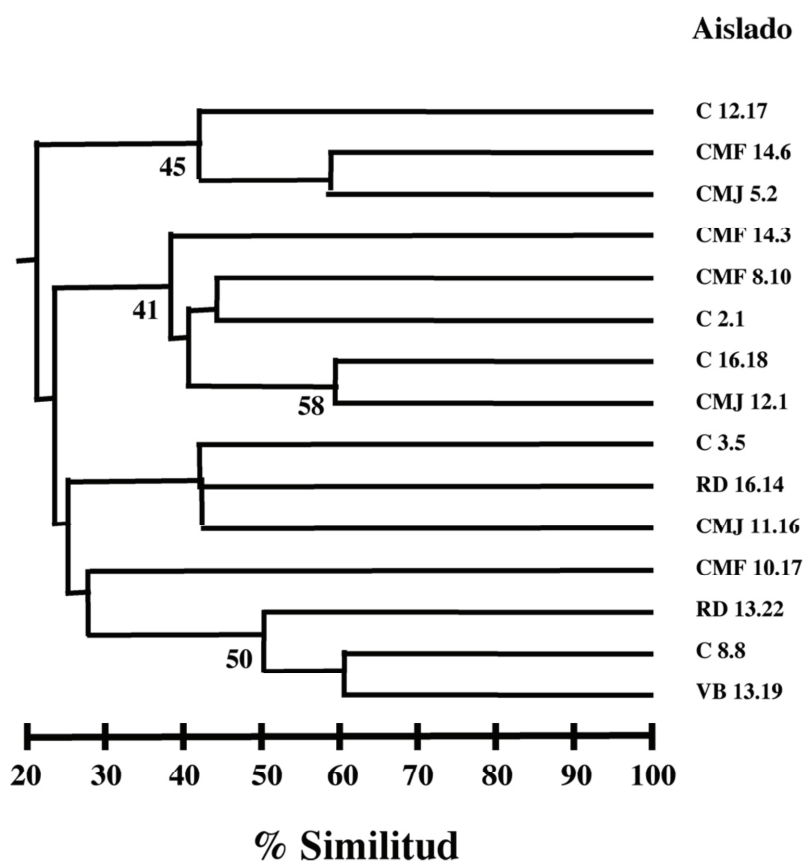


**Figura 4.12.** Dendrograma de similitud entre perfiles de REP de *V. splendidus*, obtenido mediante el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA.





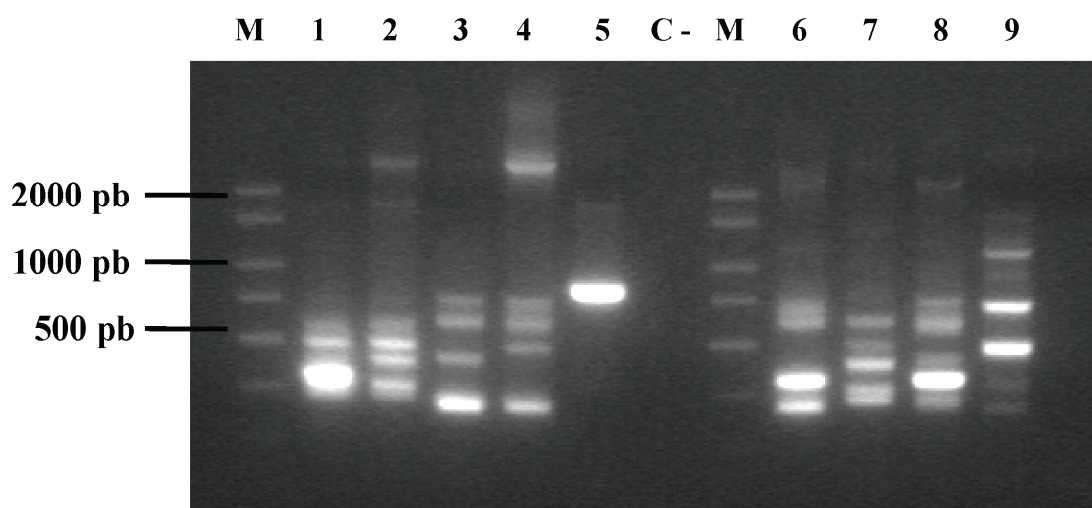
**Figura 4.13.** Patrones de ERIC-PCR de 15 aislados de *V. splendidus*. M, marcador de peso molecular( 50-2000pb; Sigma); **1**, RD 13.22; **2**, VB 13.19; **3**, C 12.17; **4**, C 3.5; **5**, CMF 10.17; **6**, C 8.8; **7**, C 2.1; **8**, CMJ 11.16; **9**, RD 16.14; **10**, CMF 14.6; **11**, CMJ 5.2; **12**, C 16.18; **13**, CMF 8.10; **14**, CMJ 12.1; **15**, CMF 14.3.



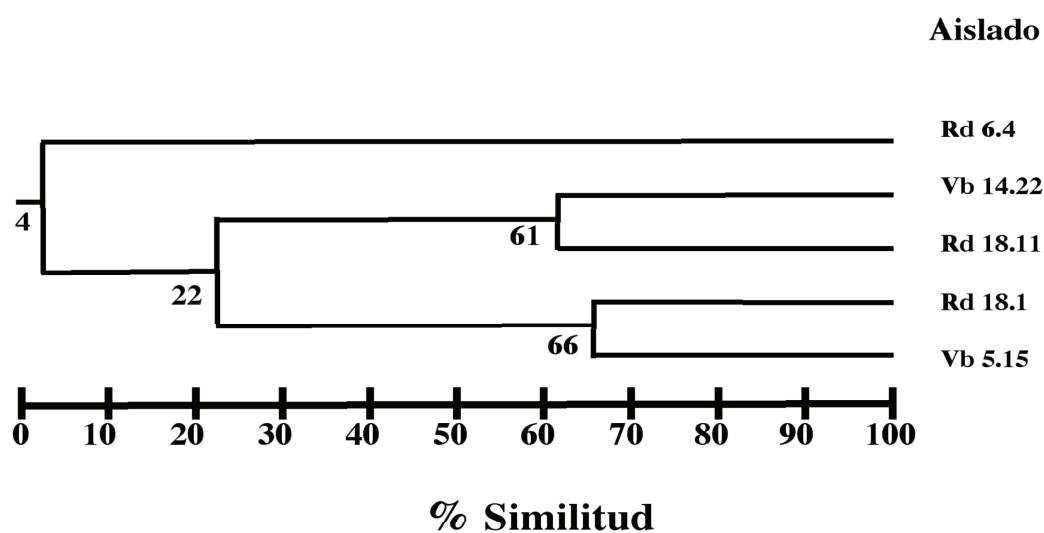
**Figura 4.14.** Dendrograma de similitud entre perfiles de ERIC de *V. splendidus*, obtenido mediante el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA.

#### 4.3.4.3. *V. alginolyticus* y *V. diabolicus*

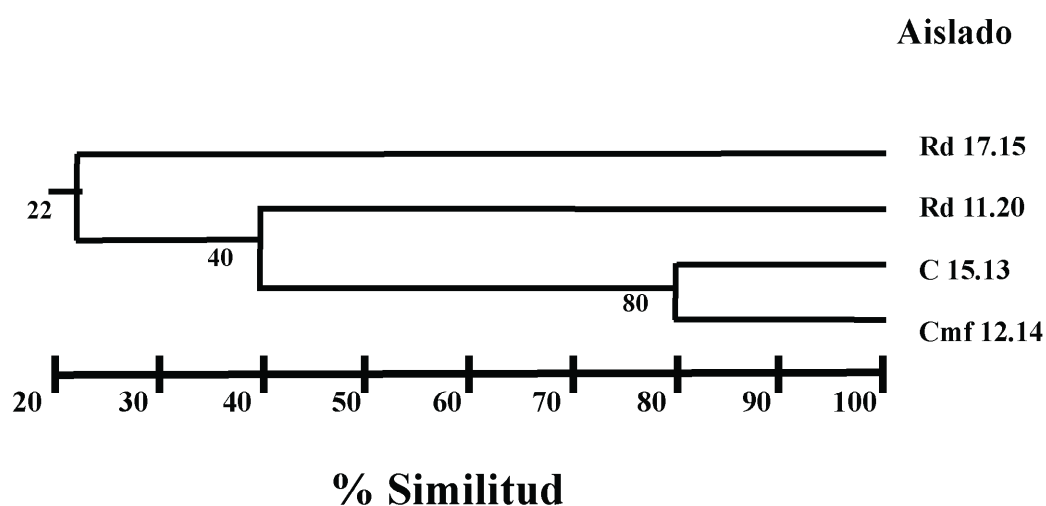
Para las cepas de *V. alginolyticus* el número de bandas de amplificación en los ensayos de REP- y ERIC-PCR fueron de 4 a 9, entre 200 y 2000 pb. Para *V. diabolicus* se amplificaron entre 4 y 9 bandas, de 150 y 2000 pb. Los aislados de estas dos especies también muestran gran heterogeneidad mediante estas técnicas, con perfiles únicos para cada cepa (Figuras 4.15 y 4.18). En *V. alginolyticus* los mayores porcentajes de similitud obtenidos fueron de 61% en REP-PCR y 87% en ERIC-PCR para las cepas RD 18.11 y VB 14.22. Para las cepas RD 18.1 y VB 5.15 se obtuvieron valores de 66% y 55% en REP- y en ERIC-PCR respectivamente (Figuras 4.16 y 4.19). En las cepas de *V. diabolicus* las cepas con mayores porcentajes de similitud son C 15.13 y CMF 12.14 con una homología del 80% mediante REP-PCR y con el 64% mediante ERIC-PCR (Figuras 4.17 y 4.20).



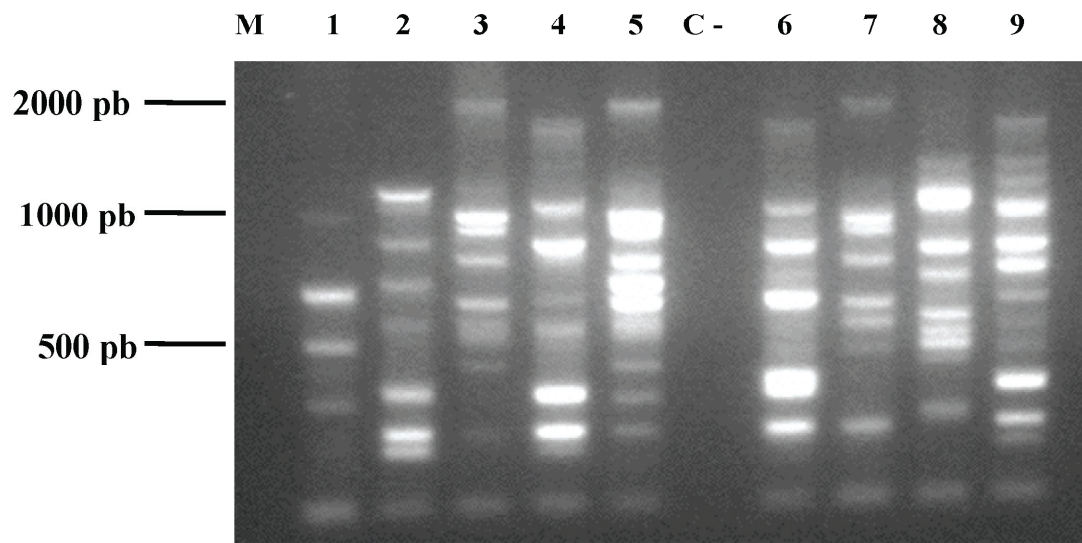
**Figura 4.15.** Patrones de REP-PCR de 5 aislados de *V. alginolyticus* (1-5) y 4 aislados de *V. diabolicus* (6-10). M, marcador de peso molecular (50-2000 pb; Sigma); **1**, VB 14.22; **2**, RD 18.11; **3**, RD 18.1; **4**, VB 5.15; **5**, RD 6.4; **6**, C 15.13; **7**, RD 17.15; **8**, CMF 12.14; **9**, RD 11.20.



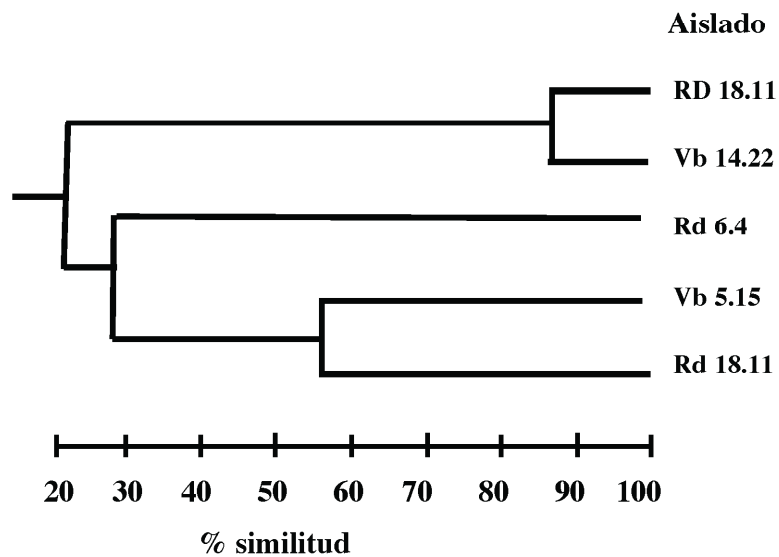
**Figura 4.16.** Dendrograma de similitud entre perfiles de REP de *V. alginolyticus*, obtenido mediante el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA.



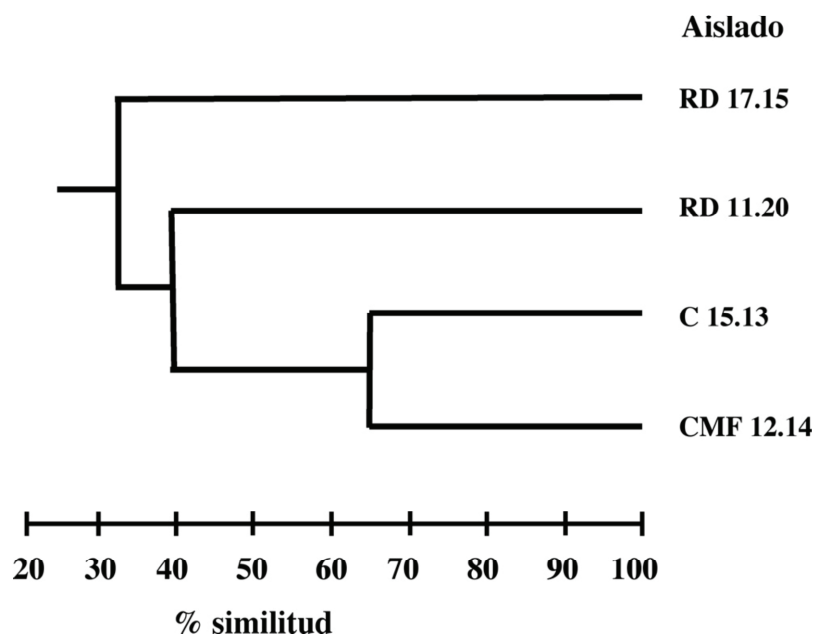
**Figura 4.17.** Dendrograma de similitud entre perfiles de REP de *V. diabolicus*, obtenido mediante el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA.



**Figura 4.18.** Patrones de ERIC-PCR de 5 aislados de *V. alginolyticus* (1-5) y 4 aislados de *V. diabolus* (6-9). M, marcador de peso molecular (50-2000 pb; Sigma); **1**, VB 14.22; **2**, RD 18.11; **3**, RD 18.1; **4**, VB 5.15; **5**, RD 6.4; **6**, C 15.13; **7**, RD 17.15; **8**, CMF 12.14; **9**, RD 11.20.



**Figura 4.19.** Dendrograma de similitud entre perfiles de ERIC de *V. alginolyticus*, obtenido mediante el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA.



**Figura 4.20.** Dendrograma de similitud entre perfiles de ERIC de *V. diabolus*, obtenido mediante el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA.

#### 4.4. DISCUSIÓN.

La técnica de AFLP ha demostrado tener aplicaciones diversas en el tipado genómico bacteriano. En general, ha resultado ser de gran utilidad para estudiar la diversidad genómica (Huys y col. 1996, Janssen y col. 1996, Arias y col. 1997, Singh y col. 2008). Permite la diferenciación y el seguimiento de bacterias a nivel de especie o cepa; ha demostrado su utilidad en aplicaciones taxonómicas (Thompson y col. 2001, Beaz-Hidalgo y col. 2008), en estudios de evolución genómica y en la determinación de las relaciones genéticas, orígenes geográficos o detección de cepas virulentas de microorganismos patógenos en estudios epidemiológicos (Lan y Reeves 2002, Whatmore y col. 2005, Keto-Timonen y col. 2006).

En el presente estudio los clusters de AFLP que se obtuvieron fueron similares a los obtenidos por Thompson y col. (2001). Además se mejoró la técnica ya que no se obtuvo ningún cluster con varias cepas tipo de distintas especies, a diferencia de lo que ocurre en el estudio de Thompson y col. (2001), en que se agrupan las cepas tipo de *V. nigripulchritudo* y *V. orientalis* en el mismo cluster, *Aliivibrio fischeri* y *Photobacterium iliopiscarium*, así como *V. penaeicida*, *V. rumoiensis* y *V. tapetis*.

De los 145 aislados analizados, 116 se distribuyeron en 29 clusters, mientras que los 29 restantes no se asignaron a ningún cluster conocido de vibrios. Se identificaron un total de 57 cepas, quedando un 60,7% de las cepas sin identificar lo que podría indicar la presencia de nuevas especies todavía no descritas.

Algunas de las cepas identificadas fenotípicamente como *V. splendidus*, *V. harveyi* o *V. diazotrophicus*, se agruparon en más de un cluster de AFLP, de forma similar a lo recogido en estudios anteriores. Vanderbergh y col. (1999) analizaron aislados de *V. harveyi* procedentes del penaeido *Litopenaeus vannamei* por los sistemas Biolog y AFLP, encontrando mayor heterogeneidad en los resultados de AFLP. Por otro lado, cepas originalmente identificadas como *V. harveyi* se dividieron en tres genogrupos diferentes en los análisis de AFLP.

En nuestro estudio no se pudo obtener una correlación entre especies de vibrio o “clusters” con el origen geográfico, ya que las especies más predominantes parecen estar distribuidas de una forma más o menos homogénea entre las 4 zonas geográficas analizadas. Tampoco se ha observado ninguna asociación entre clusters de vibrio y especie de almeja o tejido de aislamiento.

Los resultados de las identificaciones mediante métodos bioquímicos y AFLP coincidieron en un 29,82%, observándose una mayor diversidad en los grupos generados por AFLP. Aislados de un mismo grupo fenotípico se agruparon en varios clusters de AFLP (Tabla 4.3). Por ejemplo, las cepas del grupo fenotípico F1 se dividieron en 10 “clusters” distintos de AFLP; los grupos F2 y F6 en 6 “clusters”; los

grupos F4, F6 y F10 en 5 “clusters”, etc. Tras el análisis de AFLP el grupo fenotípico que exhibe la mayor diversidad es *V. splendidus* (F1 y F2). Las especies dentro del clado de *V. splendidus* poseen muchas características fenotípicas iguales o variables siendo prácticamente imposible diferenciarlas; mientras que su diversidad genómica se ha descrito como muy heterogénea (Gomez-León y col. 2005).

Se podría decir que las pruebas bioquímicas realizadas no fueron lo suficientemente informativas para poder delinear entre especies similares. La clave de identificación de Noguerola y Blanch (2008), publicada recientemente con la mayoría de las especies de *Vibrio* descritas, ha significado una ayuda en la diferenciación de especies mediante métodos bioquímicos. Sin embargo, y debido a que estos autores sólo incluyen en su estudio las cepas tipo, no recogen la posible variabilidad intraespecífica existente en algunas de las pruebas fenotípicas estudiadas. Por otro lado, esta posible variabilidad, junto con la ausencia de pruebas diferenciales en algunos grupos y las discrepancias entre los resultados de distintos autores, dificultan una identificación definitiva de especie mediante la metodología clásica de ensayos en tubo y placa.

Se secuenciaron los genes 16S rRNA, *recA*, *rpoA* y *atpA* de cepas representativas de los grupos de AFLP no identificados. Los resultados indicaron la posibilidad de tres nuevas especies, que serán abordadas en el siguiente capítulo, y de 5 especies relacionadas con el clado de *V. splendidus*. La cepa RD 8.15 probablemente sea *V. gigantis*, con la que presenta valores de 100% de similitud en el gen 16S rRNA y de 99.8% en el gen *rpoA*. La similitud en el gen *recA* fue de 93.7%, obteniéndose valores más altos y posiciones taxonómicas más próximas a otras especies dentro del grupo de *V. splendidus*. Las cepas VB 11.8 y VB 10.8 se sitúan muy cercanas a las especies *V. gigantis* y *V. crassostreae* mediante los genes 16S rRNA y *recA*, a diferencia del gen *rpoA* que las separa situándolas cerca de *V. pelagius* y *V. kanaloae* respectivamente, y del gen *atpA* que las emplaza cerca de *V. pomeroyi*, creando una rama filogenética independiente. El gen 16S rRNA sitúa las cepas VB 11.11 y RD 9.17 juntas y próximas a las especies *V. kanaloae* y *V. tasmaniensis*; en cambio los genes “housekeeping” las separan situando la cepa VB



11.11 cerca de *V. tasmaniensis*, y RD 9.17 cerca de *V. lentus* (con altos valores de “bootstrap”).

La discordancia y altos porcentajes de similitud indican que estos genes no son marcadores filogenéticos útiles para lograr diferenciar especies dentro de este clado. Además los 3 genes “housekeeping” sitúan la especie *V. pelagius*, dentro del grupo *V. splendidus* cuando no se considera que pertenezca a dicho clado. Al concatenar tres genes (16S, *recA* y *rpoA*) las posiciones taxonómicas se organizan de una forma más clara, agrupando las especies que pertenecen al grupo de *V. splendidus* y los aislados estudiados, y separando la especie *V. chagasii* en una rama independiente. De hecho, la especie *V. chagasii* se ha descrito como la especie más lejana dentro del clado de *V. splendidus* (Le Roux y col. 2004). Por otro lado, este análisis sitúa *V. pelagius* fuera del clado de *V. splendidus*, como era de esperar.

Este estudio ha revelado que AFLP es una herramienta útil en la investigación de la diversidad genómica de vibrios y los resultados de la secuenciación indican la existencia de nuevos taxones en la familia *Vibrionaceae*. Se ha demostrado que los datos fenotípicos realizados no son suficientes para poder diferenciar con exactitud entre algunas especies de vibrio.

Otro de los objetivos del trabajo fue analizar la variabilidad intraespecífica entre los aislados de los tres clusters identificados por AFLP con mayor número de cepas. La técnica de Rep-PCR basada en elementos ERIC y REP se ha empleado en el tipado molecular de diversas especies de vibrio como *V. tapetis* (Rodríguez y col. 2006), *V. parahaemolyticus* (Khan y col. 2002), *V. haliotocoli* (Sawabe y col. 2002) y *V. cholerae* (Rivera y col. 1995). Wong y Lin (2001) y Malupin y col. (2005) encontraron una alta variabilidad intraespecífica en especies de vibrio medioambientales.

En este trabajo los resultados obtenidos mediante ERIC- y REP-PCR son similares, observándose una alta variabilidad genética entre los aislados de las especies analizadas. En la mayoría de los casos no se pudieron obtener “clusters” genéticos bien definidos



debido al alto poder discriminativo de la técnica y la gran variabilidad intraespecífica. Sin embargo, la información puede ser útil en el seguimiento y trazabilidad de cepas bacterianas concretas, especialmente en casos de brotes de enfermedad. Por otro lado, en nuestro estudio no se logró relacionar la diversidad genética con el origen geográfico o de hospedador de los aislados.

En el caso de *V. cyclitrophicus*, REP-PCR ilustra mayor diversidad genética que ERIC-PCR pero coinciden en la diferenciación clara de los patrones de dos cepas. En *V. splendidus*, los aislados procedentes de los dos grupos distintos de AFLP se distribuyen en general en grupos diferenciales mediante ERIC- y REP-PCR, aunque hay excepciones. Los agrupamientos de cepas de *V. alginolyticus* y *V. diabolicus* son idénticos independientemente de la técnica utilizada. En todos los casos, la presencia de bandas comunes en cepas de una misma especie podría utilizarse para el diseño de cebadores y amplificación específica para diagnosticar su presencia (Malupin y col. 2005).

Los resultados obtenidos mediante ERIC- y REP-PCR han demostrado que estas técnicas tienen una mayor sensibilidad para detectar variaciones en el genoma a nivel de cepa que la técnica de AFLP, que agrupó los aislados a nivel de especie. La reproducibilidad de los resultados de REP-PCR fue superior a ERIC-PCR, resultado comparable al obtenido en el trabajo realizado por Wong y Lin (2001) con *V. parahaemolyticus*. Sin embargo, contrasta con los obtenidos por Malupin y col. (2005) que sugirieron una menor utilidad de REP-PCR con respecto a ERIC-PCR, por ser menos reproducible y por generar menor número de bandas de amplificación.

Basándonos en estos resultados se recomienda el uso combinado de varios métodos de tipado molecular, ya que nos aportarán mayor información en la identificación y en el agrupamiento según la diversidad genética de las cepas estudiadas.

Podemos concluir que el método de AFLP empleado en este trabajo fue útil para identificar los vibrios estudiados a nivel de especie y, junto con la secuenciación, ha

supuesto un avance en la taxonomía con la posibilidad de descripciones de nuevas especies. Los métodos de tipado molecular ERIC- y REP-PCR fueron útiles para demostrar la alta variabilidad intraespecífica en las 4 especies de vibrio medioambientales analizadas. Será necesario la consideración de esta heterogeneidad genética en futuros estudios epidemiológicos y de patogenicidad con estas especies de vibrios. Por último, la aplicación de estas técnicas a muestras medioambientales podría ayudar a mejorar el conocimiento de la diversidad de especies de vibrio relacionados con el cultivo de la almeja.

#### **IV. GENETIC CHARACTERIZATION OF *Vibrio* ISOLATES**



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



Systematic and Applied Microbiology 31 (2008) 215–222

SYSTEMATIC AND  
APPLIED MICROBIOLOGY

[www.elsevier.de/syapm](http://www.elsevier.de/syapm)

## Diversity of *Vibrios* associated with reared clams in Galicia (NW Spain)

Roxana Beaz Hidalgo<sup>a</sup>, Ilse Cleenwerck<sup>b</sup>, Sabela Balboa<sup>a</sup>, Marjan De Wachter<sup>b</sup>,  
Fabiano L. Thompson<sup>c</sup>, Jean Swings<sup>b</sup>, Paul De Vos<sup>b</sup>, Jesús L. Romalde<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología e Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

<sup>b</sup>BCCMILMG Bacteria Collection, Laboratory of Microbiology, Ghent University, Ghent, Belgium

<sup>c</sup>Department of Genetics, Institute of Biology, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

### Abstract

The aim of the present study was to characterize and identify vibrios isolated from cultured clams in Galicia (NW Spain). A total of 759 isolates were obtained, phenotypically characterized, grouped and assigned to the genus *Vibrio*. Subsequently, the genomic diversity of 145 representative strains was analyzed by means of amplified fragment length polymorphism (AFLP), which revealed a high genetic diversity amongst these isolates. Only 57 out of 145 strains could be identified to the species level, and they were distributed in 13 AFLP clusters. *V. cyclitrophicus*, *V. splendidus* and *V. alginolyticus* were the most abundantly represented species. Eighty-eight isolates remained unidentified, 59 were distributed over 16 clusters, while 29 were unclustered. Sequencing of the 16S rRNA and two house-keeping genes (*rpoA* and *recA*) from representative strains belonging to eight unidentified clusters with the highest number of isolates confirmed their assignation to the *Vibrionaceae* family, and some of these probably represent new species within the genus. The present study confirmed that the phenotypic characterization of vibrios is not sufficient to identify them at the species level. A wide diversity of vibrios was found in cultured clams from all four geographic locations analyzed. In total, more than 12 *Vibrio* species and at least three potential new species in this genus were identified.

© 2008 Elsevier GmbH. All rights reserved.

**Keywords:** Vibrios; Diversity; Clam; AFLP; Sequencing

### Introduction

The culture of clams represents an important marine resource and is of great economic importance for the coast of Galicia (NW Spain). Unfortunately, natural clam beds of the autochthonous carpet-shell clam (*Ruditapes decussatus*) have been harvested beyond their maximum sustainable yield, which has led to the introduction of the foreign Manila clam species

(*Ruditapes philippinarum*) to cover consumer demands, with the concomitant risk of introducing new pathogenic strains of bacteria [20]. Periodically, mortalities occur in these clam populations which, until now, could not be definitively associated with any infectious agent or environmental factor.

The family *Vibrionaceae* is autochthonous to aquatic environments including estuarine, coastal waters and sediments world wide, and some species are well-known pathogens of marine organisms including fish, corals and molluscs [8,14,21,24,32]. Vibriosis mainly affects nursery cultures of juvenile bivalves. Vibrios associated with infection in bivalve molluscs belong to species such

\*Corresponding author. Tel.: +34 981563100x13253;  
fax: +34 981596904.

E-mail address: [mpromald@usc.es](mailto:mpromald@usc.es) (J.L. Romalde).

as *Vibrio tapetis*, *Vibrio crassostreae*, *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio pectenicida* [15,17,19]. In Spain, mass mortalities have been reported in adult clams due to *V. tapetis* infections [4], and in seed and juveniles due to *V. splendidus* II, *V. neptunius* and *V. alginolyticus* [8,20]. Other molluscs are also susceptible to infection by vibrios, including scallops *Pecten maximus* [17], oysters *Crassostrea gigas* [34] and abalone *Haliotis diversicolor supertexta* [16]. However, scarce information exists on the occurrence of vibrios or any other bacteria that are pathogenic to cultured clams [3,19].

The main aim of this study was to analyze the *Vibrio* populations associated with cultured clams in Galicia, using a polyphasic approach which included phenotypic characterization, amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis, and sequencing of the 16S rRNA and two house-keeping genes, in order to determine the normal microbiota, as well as be able to identify potential new pathogens for these bivalve molluscs.

## Materials and methods

### Sampling, bacterial strains and growth conditions

Cultured clams were sampled monthly from four geographic locations (A–D) in the Atlantic Northwest of

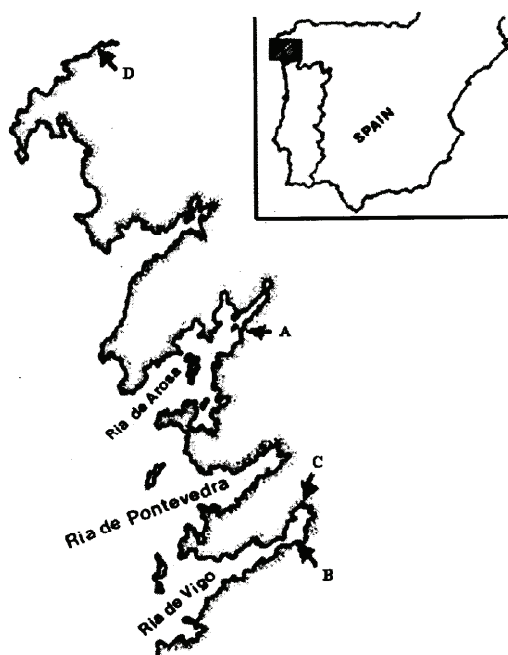


Fig. 1. Sampling sites on the Galician coast (NW Spain).

Spain (Fig. 1) from March 2004 to September 2005. Organisms were transported alive on ice to the laboratory and analyzed within 3 h. A total of 15–20 clams, depending on the size, were aseptically dissected and samples of hepatopancreas, mantle, gonad, gills and extrapalial fluid were collected. For seed or young clams, the whole organism from 15 to 20 individuals was collected and treated in the same way as the dissected organs. Homogenates were prepared by adding one volume of saline solution (0.85%) to the weighed organ samples (1:1). Samples were then serially diluted in saline solution (0.85%), plated onto marine agar (MA) (Pronadisa, Madrid, Spain) and thiosulphate citrate bile sucrose agar (TCBS, Oxoid Ltd., Basingstoke, UK), and incubated at  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  for 10 days (MA) or 48 h (TCBS). Pure cultures of the different colony morphologies were recovered on MA. Isolates were routinely grown on Marine Agar (Pronadisa) at  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  for 24 h. Stock cultures were maintained frozen at  $-80^\circ\text{C}$  in Marine Broth (Oxoid) supplemented with 15% glycerol (v/v).

### Phenotypic analysis

The bacteria isolated ( $n = 759$ ) were subjected to a set of phenotypic tests: cell morphology and motility, Gram stain, oxidase, growth on TCBS, susceptibility to the vibriostatic agent 0/129, production of arginine dihydrolase, lysine and ornithine decarboxylase, glucose fermentation, indole, hydrolysis of gelatin, starch, aesculin and Tween 80, reduction of nitrate to nitrite, production of gas from glucose, Voges Proskauer, Methyl red, growth at different temperatures (4, 37,  $44^\circ\text{C}$ ) and at different salinities (0%, 0.5%, 3%, 6%, 8%) [1,9,24].

### Genotypic analyses

A total of 145 representative strains of all phenotypic groups were selected for further genotypic analysis. At least one strain was selected from each phenotypic group. The 145 strains selected for fingerprinting by AFLP included 33 isolated from site A, 36 from site B, 29 from site C and 47 from site D.

### Genomic DNA extraction

A loop of bacterial cells was harvested from fresh cultures for genomic DNA extraction using the Easy DNA (Invitrogen, Barcelona, Spain) kit. Concentration and purity of DNA were estimated by measuring optical densities at 260 and 280 nm using a Spectra Max Plus 384 spectrophotometer (MDS Inc., Sunnyvale, CA). DNA integrity was verified by loading DNA samples on a 1% agarose gel in  $1 \times$  TAE buffer (40 mM Tris/Acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0). Extracted DNA was maintained at  $-20^\circ\text{C}$  until further use.



### AFLP analysis

AFLP is based on the amplification of subsets of genomic restriction fragments by using PCR [11,33]. DNA stock samples were diluted to obtain an initial concentration of 1 µg of DNA in 26 µl of sterile Milli Q water. DNA was digested with *TaqI* (5'TCGA3') and *HindIII* (5'AAGCTT3') (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) and double-stranded adaptors were ligated to the ends of restriction fragments with T4 ligase (Amersham Pharmacia Biotech) to generate template DNA for PCR amplification. Two subsequent PCR amplifications, pre-selective PCR and selective PCR, were performed using previously described primers and conditions [25] in a GeneAmp PCR System 9600 thermocycler (Applied Biosystems, USA). Separation of the selective PCR products was performed on a 36 cm denaturing polyacrylamide gel (4.25% acrylamide, 6 M urea in 1× TBE/89 mM Tris + 89 mM boric acid + 2 mM EDTA, pH 8.3) on an ABI Prism 377 DNA sequencer (Applied Biosystems). The level of reproducibility was controlled by generating the AFLP pattern of the strain *V. alginolyticus* LMG 4409<sup>T</sup> from the BCCM/LMG Bacteria collection (Belgian Co-ordinate Collections of Micro-organisms/Laboratory for Microbiology of the Ghent University, Belgium) in each AFLP assay performed. Tracking and normalization of the lanes were performed using the Gene Scan 3.1 software (Applied Biosystems, Norwalk, CT), and subsequent analysis was carried out by the BioNumerics 4.5 software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Similarity values were calculated using the Dice coefficient (tolerance value of 0.3%) and a dendrogram was constructed using the UPGMA algorithm. The AFLP patterns were compared with the profiles of the *Vibrionaceae* database at the BCCM/LMG Bacteria Collection, which contains 544 reference profiles representing most validly described species, previously generated mainly by Thompson et al. [25]. The cut-off similarity level for defining the AFLP clusters was 63%. In addition, strains showing similarities higher than 88% were considered as clones, following the criteria of Thompson et al. [25].

### Sequencing of the 16S rRNA, *rpoA* and *recA* genes

Clusters that could not be identified by AFLP were further analyzed by sequencing the 16S rRNA gene from representative strains, as previously described [20]. The 16S rRNA genes were amplified by PCR with universal primers pA and pH [10]. Primers [5] corresponding to internal conserved regions of this gene were used for the sequencing reactions in a TGradient thermocycler (Biometra, Germany), using a GenomeLab DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter, USA).

Sequencing of the house-keeping genes *rpoA* and *recA* was performed according to Thompson et al. [23,32].

Sequencing products were analyzed using an ABI Prism 373A DNA sequencer (Applied Biosystems). Sequence data analysis was performed with the DNASTar Seqman program (Lasergene, USA). Gene sequences of the novel strains were subjected to a BLAST search against the latest release of the GenBank and related sequences were obtained. Phylogenetic trees were constructed by neighbour-joining (NJ), with distance matrices being calculated using Kimura's two parameter correction, and stability of groupings and bootstrap analysis (1000 replicates) were performed with the Mega version 3.1 program.

### Results and discussion

A total of 759 strains were obtained from cultured clams. They were assigned to the Genus *Vibrio* on the basis of 25 morphological, physiological and biochemical characteristics, and grouped into 29 distinct clusters (Table 1). *V. splendidus* was represented by 428 isolates (i.e. 56% of the total number of isolates). The next most numerous groups were *V. alginolyticus* (48 isolates, 6.3%), *V. diazotrophicus* (41 isolates, 5.4%), *V. aestuarianus* (32 isolates, 4.2%), *V. pelagius* I/*V. superstes* (31 isolates, 4.1%) and *V. fluvialis* (28 isolates, 3.7%). The rest of the groups contained less than 20 isolates. Some groups were quite homogeneous, consisting of isolates having almost identical properties, whereas others were somewhat heterogeneous and included isolates with variable phenotypic traits. Recently, Noguerola and Blanch [18] have proposed a set of dichotomous keys for rapid identification of *Vibrio* isolates. With minor exceptions, our results were in agreement with the identification schemes proposed in their work. However, discrepancies were observed for some traits in a few species, such as growth at different temperatures and salinities or the Voges-Proskauer test in *V. diazotrophicus*, *V. scopthalmi* and *V. natriengens*. These discrepancies were probably due to the fact that these authors studied only the type strains of the different species instead of a large number of environmental isolates, as included in our work.

The AFLP analysis was performed on 145 representatives of the different phenotypic groups and also included type and reference strains of practically all known species of the genus *Vibrio*. The AFLP patterns contained from 65 to 156 bands between 50 and 536 bp in size. No clonality was observed in any of the clusters, with the AFLP similarity values among the strains always being under 88%. The similarity between patterns obtained for *V. alginolyticus* LMG 4409<sup>T</sup>, employed as a positive control in every AFLP run, was

improvement of the method for identification purposes was achieved, since no groups harboring multiple type strains were observed. On the other hand, some of the species analyzed, including *V. splendidus*, *V. harveyi* or *V. diazotrophicus*, grouped in more than one cluster, indicating the existence of intraspecific diversity within these *Vibrio* species. Similar results have been observed previously by other authors using this technique for typing different *Vibrio* species [13,28].

A wide geographical distribution was observed for most phenotypic and AFLP groups established, with no association between groups and any one specific site. The highest diversity was observed at site D, but this fact is probably related to the higher number of strains (33%) obtained from that site.

A comparison of the phenotypic and the AFLP results showed that, for isolates that could be identified at the species level by both procedures, identification was coincident in only 29.82% of the cases. Major discrepancies were observed in the heterogeneous species, such as *V. splendidus* [8]. Thus, some isolates considered as *V. splendidus* based on phenotypic results, were identified by AFLP as *V. cyclitrophicus*, *V. crassostreae*, *V. chagasii* or were unidentified.

Sequencing of the 16S rRNA gene from representative strains belonging to the eight major unidentified clusters confirmed that these isolates belonged to the genus *Vibrio*. Cluster 5 (6 strains) could be assigned to *V. tasmaniensis* (99.74% similarity). However, clusters 37 (7 strains), 48 (3 strains) and 86 (4 strains) may constitute three potential new species taking into account their 16S rRNA, *rpoA* and *recA* similarities (Table 2), as well as their relative positions to known vibrios in the phylogenetic concatenated tree (Fig. 2). These three potential new species are pending further analysis to satisfy current requirements for new species descriptions [22]. Cluster 37 was close to the *V. halotitici*-like group and showed sequence similarities in the 16S rRNA gene of 99.4% with *Vibrio*

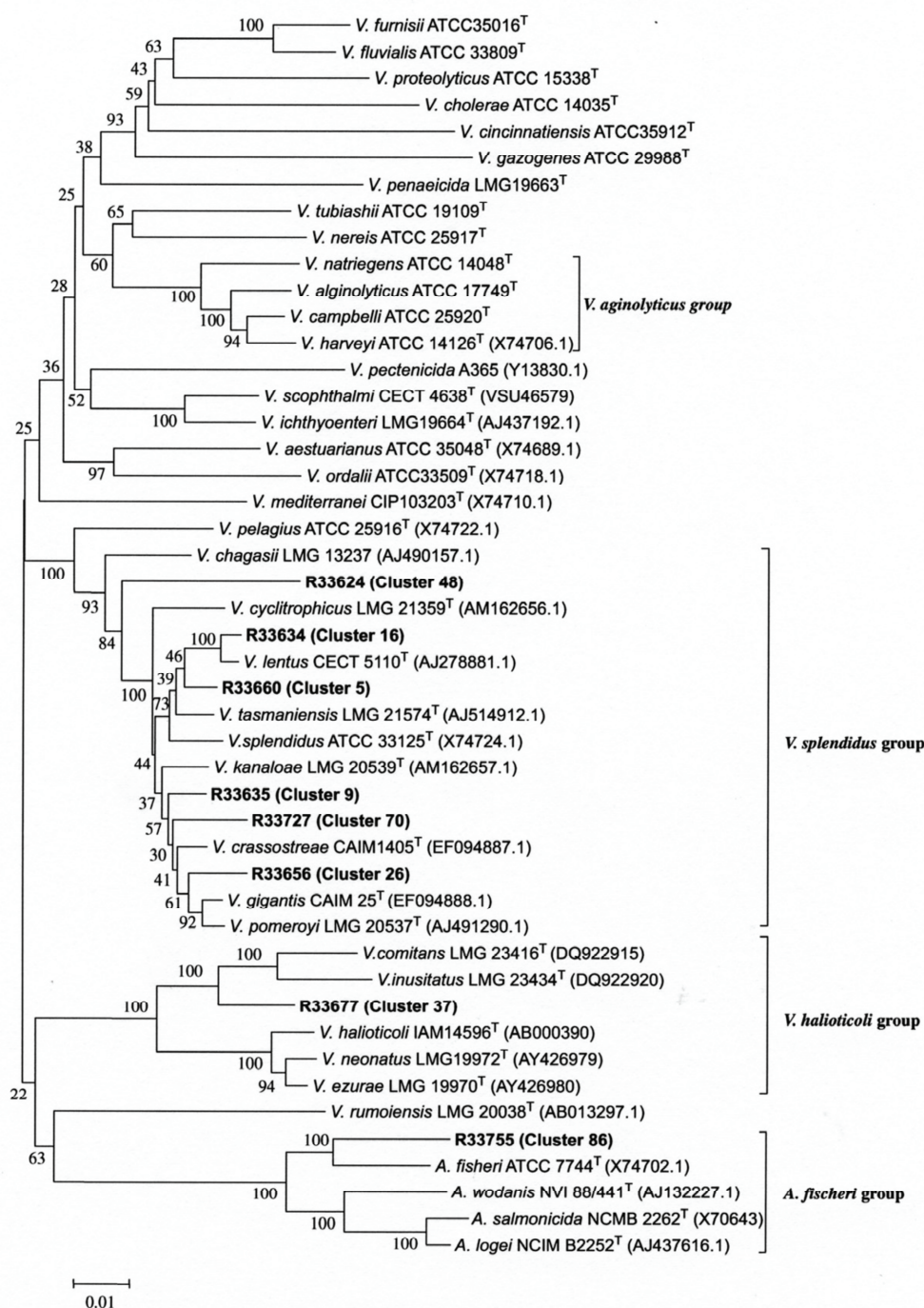
*comitans*, 99.15% with *Vibrio rarus* and 99.0% with *Vibrio inusitatus* (Table 2). However, *rpoA* and *recA* similarities were lower than 97% and 93%, respectively (Table 2), and DNA–DNA hybridization values obtained for these species were less than 36% (data not shown). Cluster 48 was close to the *V. splendidus*-like group, and showed 97.56% similarity with *V. splendidus*, 97.33% with *Vibrio gigantis* and 97.08% with *V. pomeroyi* in the 16S rRNA gene (Table 2). Cluster 86 was related to the *Aliivibrio fischeri*-like group and had 16S rRNA similarities of 98.07% with *A. wodanis*, and 97% with *A. fischeri* and *A. logei*. *A. wodanis*, the closest relative, showed similarity values in the *rpoA* and *recA* genes of 98.1% and 82%, respectively (Table 2). Clusters 9, 16, 26 and 70 were within the *V. splendidus*-like group, although further studies are needed to clarify the correct taxonomy of these isolates.

AFLP fingerprinting has been suggested as a valuable tool for classification and identification of *Vibrionaceae* strains [25], even as an alternative to DNA–DNA hybridization [12]. AFLP data have been used in the descriptions of novel *Vibrio* species such as *V. corallilyticus*, *V. neptunius*, *V. fortis*, *V. hispanicus*, *V. xuii*, *V. hepatarius*, *V. rotiferianus* and *V. tasmaniensis*, among others [2,3,6,7,25–27,29–31]. The AFLP analyses performed in this study revealed a high genetic diversity among Galician clam strains and indicated, together with the sequencing results, the existence of novel taxa within the genus *Vibrio*. This study has proved that phenotypic data give insufficient information for species delineation and that AFLP can help to uncover the prokaryotic genomic diversity. Clearly the molecular diversity and microevolution of vibrios deserve an in-depth investigation in order to understand better the ecological role of these bacteria in the aquatic environment and their possible pathogenic effect on clams and other economically important molluscs.

The GenBank/EMBL/DBJ accession numbers for the sequences obtained in this study are included in

**Table 2.** Sequence similarities (%) of the 16S rRNA, *recA* and *rpoA* genes of three potential new *Vibrio* species and their closely related species

Species	R33677 (Cluster 37)			R33624 (Cluster 48)			R33755 (Cluster 86)		
	16S	<i>recA</i>	<i>rpoA</i>	16S	<i>recA</i>	<i>rpoA</i>	16S	<i>recA</i>	<i>rpoA</i>
<i>V. comitans</i>	99.4	93.0	99.8	–	–	–	–	–	–
<i>V. rarus</i>	99.1	84.0	94.0	–	–	–	–	–	–
<i>V. inusitatus</i>	99.0	91.0	96.0	–	–	–	–	–	–
<i>V. splendidus</i>	–	–	–	97.6	86.5	97.8	–	–	–
<i>V. gigantis</i>	–	–	–	97.3	86.0	97.0	–	–	–
<i>V. pomeroyi</i>	–	–	–	97.1	86.0	97.8	–	–	–
<i>A. wodanis</i>	–	–	–	–	–	–	98.1	82.0	98.1
<i>A. fischeri</i>	–	–	–	–	–	–	97.1	89.0	97.2
<i>A. logei</i>	–	–	–	–	–	–	97.8	82.0	97.4
<i>A. salmonicida</i>	–	–	–	–	–	–	96.0	81.0	97.5



**Fig. 2.** NJ phylogenetic tree based on concatenated sequences of the *recA*, *rpoA* and 16S rRNA genes. Horizontal branch lengths proportional to evolutionary divergence. Bootstrap percentages from 1000 replicates appear next to the corresponding branch. Similar results were obtained using the Maximum-Parsimony method (data not shown).



**Table 3.** Accession numbers for sequences of the 16S, *recA* and *rpoA* genes determined in the laboratory

Strain	Cluster	16S	<i>recA</i>	<i>rpoA</i>
33660	5	EF599163	EU541589	EU541569
R33635	9	EF500162	EU541590	EU541570
R33634	16	EU541607	EU541592	EU541572
R33656	26	EU541606	EU541591	EU541571
R33677	37	EF599161	EU541585	EU541565
R33624	48	EU541605	EU541587	EU541566
R33727	70	EF599164	U541588	EU541568
R33755	86	EU541604	U541586	U541567
<i>V. gigantis</i> DSM 18531 <sup>T</sup>			EU541593	EU541573
<i>V. crassostreae</i> LMG 22240 <sup>T</sup>			EU541594	EU541574
<i>V. comitans</i> LMG23416 <sup>T</sup>			EU541597	U541577
<i>V. rarus</i> LMG 23674 <sup>T</sup>			EU541599	EU541578
<i>V. inusitatus</i> LMG 23434 <sup>T</sup>	5		EY541600	EU541579

Table 3. A table with the phenotypic and AFLP identification for each isolate, and the phylogenetic trees for each of the genes analyzed are available as supplementary material in SAM Online.

### Acknowledgments

This work was supported in part by Grants AGL2003-09307-C02-01 from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), and PGIDIT04PXIC20001PN from the Xunta de Galicia, Spain. R. Beaz and S. Balboa thank the MEC for a research fellowship.

### Appendix A. Supplementary materials

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.syapm.2008.04.001.

### References

- [1] B. Austin, J.V. Lee, *Aeromonaceae* and *Vibrionaceae*, in: R.G. Board, D. Jones, F.A. Skinner (Eds.), *Identification Methods in Applied and Environmental Microbiology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1992, pp. 163–182.
- [2] Y. Ben-Haim, F.L. Thompson, C.C. Thompson, M.C. Cnockaert, B. Hoste, J. Swings, E. Rosenberg, *Vibrio corallilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 (2003) 309–315.
- [3] J.J. Borrego, D. Castro, A. Luque, C. Paillard, P. Maes, M.T. Garcia, A. Ventosa, *Vibrio tapetis* sp. nov.: the causative agent of brown ring disease affecting cultured clams, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46 (1996) 480–484.
- [4] A. Figueras, J.A.F. Robledo, B. Novoa, Brown ring disease and parasites in clams (*Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*) from Spain and Portugal, *J. Shellfish Res.* 15 (1996) 363–368.
- [5] G. Funke, C.P. Ramos, M.D. Collins, Identification of some clinical strains of CDC coryneform group A-3 and A-4 bacteria as *Cellulomonas* species and proposal of *Cellulomonas hominis* sp. nov. for some group A-3 strains, *J. Clin. Microbiol.* 33 (1995) 2091–2097.
- [6] B. Gomez-Gil, F.L. Thompson, C.C. Thompson, J. Swings, *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 (2003) 239–243.
- [7] B. Gomez-Gil, F.L. Thompson, C.C. Thompson, A. Garcia-Gasca, A. Roque, J. Swings, *Vibrio hispanicus* sp. nov., isolated from *Artemia* sp. and sea water in Spain, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 (2004) 261–265.
- [8] J. Gómez-León, L. Villamil, M.L. Lemos, B. Novoa, Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 98–104.
- [9] J.G. Holt, N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, S.T. Williams (Eds.), *Bergey's Manual of Determinative Microbiology*, ninth ed, Williams & Wilkins Co, Baltimore, MD, 1994.
- [10] R.A. Hutson, D.E. Thompson, M.D. Collins, Genetic interrelationships of saccharolytic *Clostridium botulinum* types B, E and F and related clostridia as revealed by small-subunit rRNA gene sequences, *FEMS Microbiol. Lett.* 108 (1993) 103–110.
- [12] P.J.D. Janssen, Selective restriction fragment amplification by AFLP, in: L. Dijkshoorn, K.J. Towner, M. Struelens (Eds.), *New Approaches for the Generation and Analysis of Microbial Typing Data*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2001, pp. 177–210.
- [11] P. Janssen, R. Coopman, G. Huys, J. Swings, M. Bleeker, P. Vos, M. Zabeau, K. Kersters, Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool for bacterial taxonomy, *Microbiology* 142 (1996) 1881–1893.

- [13] S.C. Jiang, V. Louis, N. Choopun, A. Sharma, A. Huq, R.R. Colwell, Genetic diversity of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay determined by Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 140–147.
- [14] A. Kushmaro, E. Banin, Y. Loya, E. Stackebrandt, E. Rosenberg, *Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 (2001) 1–6.
- [15] C. Lambert, J.L. Nicolas, V. Cilia, S. Corre, *Vibrio pectenica* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 (1998) 481–487.
- [16] P.C. Liu, Y.C. Chen, K.K. Lee, Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*, *Microbios* 104 (2001) 71–77.
- [17] J.L. Nicolas, S. Corre, G. Gauthier, R. Robert, D. Ansquer, Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture, *Dis. Aquat. Org.* 27 (1996) 67–76.
- [18] I. Nogueraola, A.R. Blanch, Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys, *J. Appl. Microbiol.* 104 (2008).
- [19] C. Paillard, P. Maes, R. Oubella, Brown ring disease in clams, *Ann. Rev. Fish Dis.* 4 (1994) 219–240.
- [20] S. Prado, J.L. Romalde, J. Montes, J.L. Barja, Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen, *Dis. Aquat. Org.* 67 (2005) 209–215.
- [21] T. Sawabe, K. Hayashi, J. Moriwaki, F.L. Thompson, J. Swings, P. Potin, R. Christen, Y. Ezura, *Vibrio gallicus* sp. nov., isolated from the gut of the French abalone *Haliotis tuberculata*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 (2004) 843–846.
- [22] E. Stackebrandt, W. Frederiksen, G.M. Garrity, P.A. Grimont, P. Kampf, M.C.J. Maiden, X. Nesme, R.A. Rossello-Mora, Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 (2002) 1043–1047.
- [25] F.L. Thompson, B. Hoste, K. Vandeneulebroecke, J. Swings, Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different source determined by Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism, *Syst. Appl. Microbiol.* 24 (2001) 520–538.
- [26] F.L. Thompson, C.C. Thompson, J. Swings, *Vibrio tasmaniensis* sp. nov. isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *Syst. Appl. Microbiol.* 26 (2003) 65–69.
- [27] F.L. Thompson, Y. Li, B. Gomez-Gil, C.C. Thompson, B. Hoste, K. Vandeneulebroecke, G.S. Rupp, A. Pereira, M.M. De Bem, P. Sorgeloos, J. Swings, *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps), *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 (2003) 245–252.
- [28] F.L. Thompson, C.C. Thompson, A.C.P. Vicente, G.N.D. Theophilo, E. Hofer, J. Swings, Genomic diversity of clinical and environmental *Vibrio cholerae* strains isolated in Brazil between 1991 and 2001 as revealed by Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis, *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003) 1946–1950.
- [29] F.L. Thompson, C.C. Thompson, B. Hoste, K. Vandeneulebroecke, M. Gullian, J. Swings, *Vibrio fortis* sp. nov. and *Vibrio hepatarius* sp. nov., isolated from aquatic animals and the marine environment, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 (2003) 1495–1501.
- [30] F.L. Thompson, C.C. Thompson, Y. Li, B. Gomez-Gil, K. Vandeneulebroecke, B. Hoste, J. Swings, *Vibrio kanaloae* sp. nov., *Vibrio pomeroyi* sp. nov. and *Vibrio chagasii* sp. nov., from sea water and marine animals, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 (2003) 753–759.
- [23] C.C. Thompson, F.L. Thompson, K. Vandeneulebroecke, B. Hoste, P. Dawyndt, J. Swings, Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family *Vibrionaceae*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 (2004) 919–929.
- [24] F.L. Thompson, T. Iida, J. Swings, Biodiversity of *Vibrios*, *Microbiol. Mol. Rev.* 68 (2004) 403–431.
- [31] F.L. Thompson, D. Gevers, C.C. Thompson, P. Dawyndt, S. Naser, B. Hoste, C.B. Munn, J. Swings, Phylogeny and molecular identification of *Vibrios* on the basis of Multilocus Sequence Analysis, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 5107–5115.
- [32] A.E. Toranzo, B. Magariños, J.L. Romalde, A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems, *Aquaculture* 246 (2005) 37–61.
- [33] P. Vos, R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijns, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, M. Zabeau, AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Res.* 23 (1995) 4407–4414.
- [34] M. Waechter, F. Le Roux, J.L. Nicolas, E. Marissal, F. Berthe, Characterization of pathogenic bacteria of the cupped oyster *Crassostrea gigas*, *C. R. Biol.* 325 (2002) 231–238.

### **ERIC and REP-PCR analysis of predominant *Vibrio* species identified by AFLP.**

In this study a total of 41 strains, isolated from cultured clams and previously identified by AFLP, were analyzed by ERIC and REP PCR. A total of 17 strains of *V. cyclitrophicus*, 15 *V. splendidus*, 5 *V. alginolyticus* and 4 *V. diabolicus* were used. All PCR amplifications were performed in a temperature gradient thermal cycler (Biometra) using the Ready-To-Go PCR beads kit (Amersham Pharmacia Biotech). These commercial beads include all the reagents needed for the PCR reactions (nucleotides, buffer and Taq polymerase) with the exception of the primers (100 pmol each), the DNA template (100 ng), and water which were added to complete a final volume of 25 µl. The sets of primers for ERIC and REP and PCR protocols used in this study have been previously described (Stern *et al.* 1984, Versalovic *et al.* 1991). In all cases the reproducibility of the results was assessed by repetition of the amplifications in at least three independent ERIC-PCR and REP-PCR assays. Amplification products were analyzed on 1.5% (wt:vol) agarose gels with tris-acetate-EDTA electrophoresis buffer and were visualized with an ultraviolet transilluminator after staining with ethidium bromide (2 µg/ml). A 50-2000 base pair ladder (Sigma Chemical) was used as a molecular mass ladder. All gels were scanned and the images captured by a GelDoc-2000 gel documentation system (Bio-Rad). The data analysis was performed using Diversity Database software (BioRad), and the computed similarities among strains were estimated by means of the Dice coefficient (Dice 1945). Cluster analysis was done and dendrograms produced following the unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA).

The results obtained were similar, observing a high genetic diversity between isolates of the species *V. splendidus*, *V. alginolyticus* and *V. diabolicus* but lower for *V. cyclitrophicus*. No genetic well defined clusters were obtained as a consequence of the high genetic intraspecies variability, but the information could be useful for the monitoring of strain distribution, especially if it's the case of a pathogenic outbreak. Genetic diversity could neither be related to the geographic distribution, strains from all locations were obtained in all clusters.

For *V. cyclitrophicus*, a higher genetic diversity was obtained by REP-PCR in comparison with ERIC-PCR, both techniques were coincident in the differentiation of two strains with clearly different profiles (VB 11.4 and VB 14.16). A total of 11 genetic profiles were obtained for REP-PCR. The main 4 clusters shared similarities > 80% (Figures 4.7 and 4.8). With ERIC-PCR 7 genetic profiles were obtained, profiles I, II and III had 6, 5 and 2 isolates respectively and shared 68%, 71% and 60% genetic similarity respectively (Figures 9 and 10).

Previously in this Chapter, 15 *V. splendidus* strains were divided into 2 AFLP groups, cluster 6 (9 strains) and cluster 7 (6 strains). Higher genetic diversity was obtained when analyzed with the ERIC and REP-PCR techniques. REP profiles were divided into 4 groups with low percentage similarities (< 40%). Strains from groups I and II belonged to the AFLP cluster 7 with the exception of strains C 12.17 and C 2.1, those from groups II and IV belonged to AFLP cluster 6 (Figures 4.11 and 4.12). All isolates proved to have high genetic intraspecies diversity. REP and ERIC-PCR results identified CMF 14.6 and CMJ 5.2 as the most similar strains, sharing 88.5% and 100% homology respectively. The rest of the ERIC-PCR profiles were strain specific. Three main groups were differentiated with similarities > 30%. Strains from groups I and III belonged to both of the AFLP clusters. Isolates from group II belonged to the AFLP group 6 (Figures 4.13 and 4.14).

ERIC and REP-PCR results for *V. alginolyticus* and *V. diabolicus* strains were coincident, all strains showed high heterogeneity (Figures 4.15 and 4.18). *V. alginolyticus* isolates RD 18.11 and VB 14.22 shared the highest genetic similarity with 61% and 87% in the REP and ERIC profiles respectively. For RD 18.1 and VB 5.15 the values were 66% for REP and 55% for ERIC-PCR (Figures 4.16 and 4.19). For *V. diabolicus* the isolates with higher percentage similarities in the genetic profiles were C 15.13 and CMF 12.14 having 80% in REP-PCR and 64% in ERIC-PCR (Figures 4.17 and 4.20).

ERIC and REP-PCR results have demonstrated a higher sensitivity to detect genome variations at the strain level in comparison with the AFLP technique that grouped the isolates to species level. In this study REP-PCR results were more reproducible than ERIC-PCR, agreeing with the work performed by Wong & Lin (2001) with *V. parahaemolyticus*, but not with the study by Malupin *et al.* (2005).

The AFLP technology allowed the identification of vibrios to species level, together with sequencing techniques have resulted in a great advance in bacterial taxonomy for the description of new species. The molecular typing methods of ERIC and REP-PCR were useful to demonstrate the high genetic intraspecies diversity of the 4 *Vibrio* species analyzed. Future studies of the genetic heterogeneity would be required for further epidemiological and pathogenicity studies. The applications of these techniques to environmental samples would mean a greater knowledge in the species diversity of vibrios in the culture of clams.



**V. DESCRIPCIÓN DE TRES NUEVAS ESPECIES DE  
*Vibrionaceae*.**

## 5. DESCRIPCIÓN DE TRES NUEVAS ESPECIES DE *Vibrionaceae*.

### 5.1. INTRODUCCIÓN.

#### 5.1.1. Taxonomía del género *Vibrio*.

La taxonomía de vibrios comienza con la taxonomía de procariotas. En 1854 fue Filippo Pacini quien descubrió la primera especie del género *Vibrio*, *Vibrio cholerae*, agente causal de un brote mortal de cólera en Florencia. Treinta años más tarde, Robert Koch logró aislar el patógeno procedente de brotes en India y Egipto. Koch se dio cuenta de que los vibrios estaban distribuidos en una gran variedad de ambientes acuáticos y que había muchos tipos que no eran patógenos en el hombre. Las primeras especies no patógenas descubiertas fueron *Vibrio fischeri*, *V. splendidus* y *Photobacterium phosphoreum*, descritas por el microbiólogo Martines Beijerinck después del año 1880. En un principio la taxonomía de vibrios se basaba en el análisis de características fenotípicas como la morfología celular, presencia de flagelo y aspectos de cultivo. Estos estudios describieron nuevas especies en base a una pobre caracterización. De las 34 especies de *Vibrio* descritas en la séptima edición del “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” dentro de la familia *Spirillaceae*, *V. cholera* y *V. metschnikovii* fueron las únicas especies que mantuvieron su taxonomía, mientras que el resto se clasificaron en otros géneros o se rechazaron como especies validadas (Breed y col. 1957, citado en Thompson y Swings 2006). Hace treinta y cinco años se llevó a cabo un estudio polifásico con nuevas tecnologías como hibridación DNA-DNA, contenido G+C, diferencias en secuencias de aminoácidos y un gran número de características fenotípicas, incluyendo la utilización como fuente de carbono de lípidos, proteínas, carbohidratos, aminoácidos, ácidos y alcoholes, actividades enzimáticas, luminiscencia, condiciones de crecimiento (temperatura y salinidad) y sensibilidad a quimioterápicos, entre muchas otras (Colwell, 1970). Estudios posteriores de hibridación DNA-DNA de Baumann y colaboradores fueron cruciales en la taxonomía de Vibrios (Baumann y Schubert 1984, Baumann y col. 1984, Reichelt y col. 1976). Encontraron un grupo de vibrios relacionados con *V. harveyi* compuesto por *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. natriegens*, *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*. Los valores de hibridación DNA-DNA que encontraron fueron 61-74% entre *V. harveyi* y *V.*



*campbellii*, y 61-67% entre *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*, lo que sirvió para diferenciar estas especies.

A finales de los años 80 la secuenciación de los genes 5S y 16S rRNA revolucionó la taxonomía de los procariotas. Hoy en día todavía se basa en el gen 16S rRNA, pero cada vez hay más necesidad de otros marcadores filogenéticos alternativos para identificaciones a nivel de especie en algunos grupos bacterianos. Actualmente se estudian una gran variedad de genes para lograr completar la filogenia obtenida con el gen 16S rRNA. La aplicación de la reciente técnica de análisis de secuencias multilocus (MLSA), de la cual se habló en el capítulo anterior, ha supuesto un gran avance. La amplificación de genes “housekeeping” y los análisis filogenéticos de genes concatenados han logrado definir con mayor exactitud la taxonomía actual de vibrios. Hoy la familia *Vibrionaceae* engloba nueve géneros: *Vibrio*, *Allomonas*, *Catenococcus*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Listonella*, *Photobacterium*, *Salinivibrio* y el más reciente *Aliivibrio* (Urbanczyk y col. 2007). Otras metodologías genómicas basadas en la amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) que también han aportado al avance en la taxonomía de vibrios incluyen RAPD, AFLP y REP-PCR (Arias y col. 1997, Austin y col. 1997, Byoung-Kwon y col. 2003, Vos y col. 1995).

#### **5.1.2. Una perspectiva global de los Vibrios en el medio acuático.**

Las bacterias de la familia *Vibrionaceae* pertenecen a las  $\gamma$ -proteobacterias, son Gram negativas, normalmente bacilos móviles, mesófilas y quimiorganotróficas, poseen un metabolismo fermentativo facultativo, requieren sal para crecer, degradan quitina y la mayoría poseen dos cromosomas (Okada y col. 2005).

Su distribución es amplia en distintos hábitats acuáticos de todo el mundo, desde estuarios a aguas costeras, donde predominan, hasta grandes profundidades. Se asocian a organismos marinos siendo en muchos casos patógenas para especies cultivadas en el mar, así como para humanos que consumen productos o agua contaminados. Los cuatro patógenos más importantes para el hombre son *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, siendo los dos últimos

patógenos también para peces. Otros patógenos importantes relacionados con la industria de la acuicultura son *V. anguillarum* y *Aliivibrio salmonicida*, que afectan a varias especies de peces (Austin y Austin 1999), *V. harveyi*, que afecta principalmente a crustáceos como *Penaeus monodon* (Lavilla-Pitogo y col. 1998, Vanderberghen y col. 1999), y *V. tapetis*, *V. crassostreae*, *V. alginolyticus*, *V. splendidus*, *V. pectenecida* y *V. aestuarianus* que afectan a moluscos bivalvos (Nicolas y col. 1996, Lambert y col. 1998, Gomez-León y col. 2005, Garnier y col. 2007). Normalmente las etapas larvarias, tanto en peces como en bivalvos, son las más sensibles a la vibriosis (Prado y col. 2005), con excepción del patógeno *V. tapetis* que afecta a almejas adultas (Paillard y col. 1994). También se ha descrito el potencial de los vibrios como probióticos que benefician especies cultivadas, aunque aún no se ha logrado a escala comercial (Verschuere y col. 2000, Prado 2006).

Muchas especies poseen una gran variedad de funciones en el medio acuático. Se ha demostrado su papel en la cadena trófica acuática reciclando nutrientes; absorben materia orgánica disuelta y proveen de ácidos grasos poliinsaturados a organismos acuáticos incapaces de producirlos (Nichols 2003). Las bacterias del género *Vibrio* también son importantes en el ciclo del nitrógeno en el medio marino fijando nitrógeno atmosférico, como es el caso de *V. diazotrophicus* que fija el nitrógeno que sirve para la nutrición proteica del erizo de mar (Guerinot y Patriquin 1981). Otros microorganismos de la familia *Vibrionaceae* se han relacionado con interacciones simbióticas microbio-hospedador; como las especies del género *Aliivibrio*, *A. fischeri* y *A. logei*, conocidas por su asociación con especies de calamar como *Euprymna scolopes* (Stabb 2006). Estas relaciones simbióticas se abordarán con mayor profundidad más adelante.

En ecosistemas acuáticos naturales la distribución y abundancia de especies bacterianas está influenciada por factores abióticos como la temperatura, salinidad y presencia de nutrientes; pero también por factores bióticos como la competición con otras especies bacterianas, infecciones víricas y el ataque de protozoos.

La salinidad es un factor determinante para casi todas las especies de *Vibrio*, ya que necesitan iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) para los translocadores de energía de la membrana citoplasmática, así como iones inorgánicos para mantener la integridad de la pared celular y membrana. Las únicas especies que crecen al 0% de NaCl son *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. fluvialis* y *V. furnissii*, todas de origen clínico (Farmer y Hickman-Brenner 1992) y que se encuentran en ambientes de agua dulce. Por el contrario, las especies del género *Photobacterium* nunca se han detectado en ambientes de agua salobre ni dulce. Entre los vibrios halófilos destaca *V. costicola*, reclasificado como *Salinivibrio costicola* (Mellado y col. 1996). En este contexto se podría decir que condiciones extremas de salinidad han contribuido a la evolución bacteriana en la familia *Vibrionaceae*.

En lo que respecta a la temperatura, un número reducido de vibrios se han adaptado a ambientes muy fríos, los psicrófilos y psicrotolerantes, en los cuales también se profundizará más adelante. *Vibrio tapetis*, causante del anillo marrón en almeja, sin estar clasificado dentro de estos términos también se adapta a ambientes fríos, crece a 4°C pero no a 30°C (Borrego y col. 1996). Casi todas las especies de *Vibrio* suelen crecer a 30°C, mientras que a temperaturas por encima de 37°C sólo crecen especies de origen clínico, como puede ser *V. cholerae* que crece hasta 42°C.

En la última década, las técnicas moleculares han permitido afinar en la taxonomía vibrios, con la descripción de un gran número de nuevas especies, así como la reclasificación de otras (Urakawa y col. 1998, 1999b, Faury y col. 2004, Sawabe y col. 2004a, b, 2007, Thompson y col. 2003a, b, d, e, Le Roux y col. 2005, Urbanczyk y col. 2007). A continuación se profundizará en tres grupos diferentes dentro de los géneros *Vibrio* y *Aliivibrio*.

### **5.1.3. Especies del clado *Vibrio haliotocoli*.**

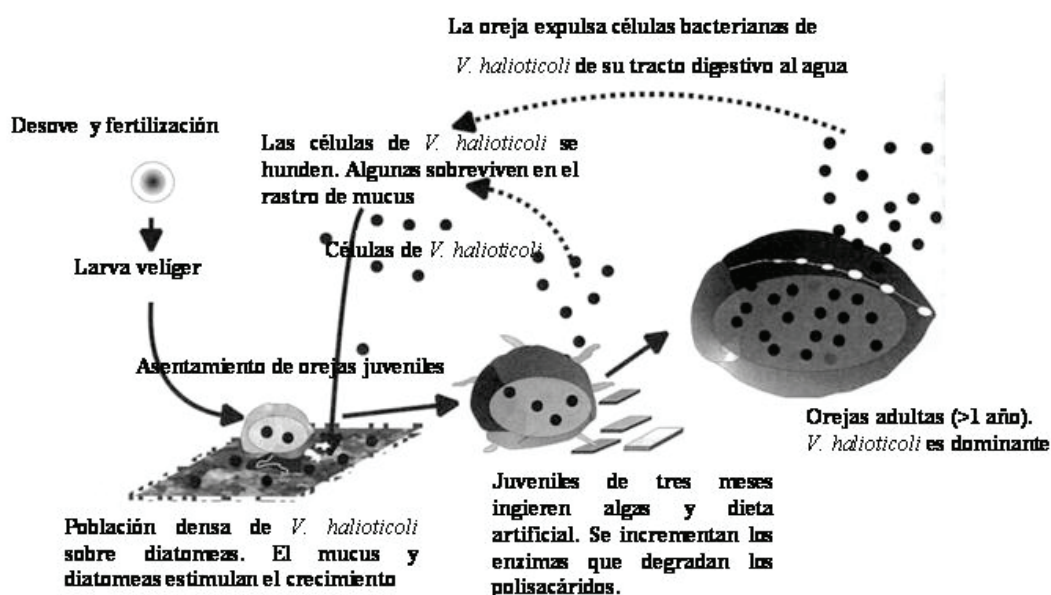
El nombre específico de *Vibrio haliotocoli* significa “del tracto digestivo de *Haliotis*” que es de donde el microorganismo se aisló originalmente. Posteriormente, se han encontrado especies cercanas a *V. haliotocoli* asociadas a nichos ecológicos similares. La especie pionera, descrita por Sawabe y col. (1998), y las especies relacionadas son bacterias marinas fermentativas, alginolíticas e inmóviles por carecer de flagelo. Su

distribución abarca todo el mundo, desde Japón (Sawabe y col. 1995, 1998, 2002, 2004a, 2007), Australia (Hayashi y col. 2003) o Sudáfrica (Sawabe y col. 2003) hasta Francia (Sawabe y col. 2004b). En la actualidad existen 8 especies descritas dentro del grupo que son *V. halioticoli*, *V. ezurae*, *V. neonatus*, *V. superstes*, *V. gallicus*, y las más recientes *V. comitans*, *V. inusitatus* y *V. rarus* (Hayashi y col. 2003, Sawabe y col. 2004a, b, 2007). *Vibrio gallicus* es la especie más divergente del grupo de *V. halioticoli*, con sólo un 97% de similitud en el gen 16S rRNA.

Se han encontrado diferencias fenotípicas entre especies en la utilización de carbohidratos y ácidos orgánicos. Las especies *V. ezurae*, *V. neonatus* y *V. gallicus* no utilizan una variedad tan grande de fuentes de carbono como *V. halioticoli* (Sawabe y col. 1998, 2004a, b). Por el contrario *V. superstes* posee un metabolismo más activo y es capaz de utilizar un número mayor de fuentes de carbono (Hayashi y col. 2003). Tres especies, *V. comitans*, *V. inusitatus* y *V. rarus*, están más cercanas a *V. superstes* que a *V. halioticoli* en el árbol filogenético.

Se ha sugerido que la relación entre las especies del clado de *V. halioticoli* y las orejas de mar es simbiótica. Se sabe que estas especies carecen de flagelo. Una posible explicación reside en una co-evolución bacteria-hospedador: al asociarse las bacterias al hospedador no requieren la utilización del flagelo. Podrían suceder entonces procesos de represión de la expresión de los genes responsables o bien alteraciones genéticas en los operones del flagelo, dando lugar a la actual bacteria inmóvil sin flagelo (Sawabe 2006). Lo más importante de la simbiosis vibrio-oreja de mar es el metabolismo cooperativo de carbohidratos de algas, como el alginato. El alginato es un polisacárido lineal y uno de los componentes mayoritarios en algas feofíceas, alimento para orejas de mar. Las distintas especies del grupo de *V. halioticoli* producen enzimas que degradan este polisacárido (Sawabe y col. 1998, 2004a, b, Hayashi y col. 2003). Las orejas son capaces de digerir parte de la molécula de alginato (los polimanuronatos) a trisacáridos obteniendo energía en el proceso. Los vibrios simbióticos utilizan otra parte de la molécula del alginato (los poligluconatos) que la oreja es incapaz de usar, y sus enzimas lo degradan y transforman en desecho del hospedador (ácido acético). Así los vibrios

son parejas efectivas de las especies de *Haliotis*. Esta armonía simbiótica que existe es un gran ejemplo del concepto de la coevolución y de las interacciones vibrio-animal acuático. La Figura 5.1 muestra el ciclo de vida simbiótica entre *V. halioticoli* y la oreja de mar. Hasta la fecha no se ha logrado aislar ninguna especie del tipo *V. halioticoli* a partir de otro molusco distinto a orejas de mar.



**Figura 5.1.** La ecofisiología de *V. halioticoli* en el ciclo de vida de la oreja de mar.

Obtenido de Thompson y col. (2006)

#### **5.1.4. Especies del clado *Vibrio splendidus*.**

*Vibrio splendidus* es una bacteria dominante en sedimentos marinos costeros (Sobecky y col. 1998), en el agua de mar (Urakawa y col. 1999b), en peces (Jensen y col. 2003) y en bivalvos. En el caso de ostras (*O. edulis*) cultivadas en el Mediterráneo se ha encontrado una asociación hospedador-invertebrado con cepas de *V. splendidus* (Pujalte y col. 1999, Macián y col. 2000b). La especie fue descrita por Beijerinck en 1890, y originalmente se han considerado 2 biotipos distinguibles por métodos fenotípicos

(Baumann y col. 1980, Baumann y Schubert 1984, Alsina y Blanch 1994). Algunos estudios han sugerido que los dos biotipos pueden ser especies diferentes ya que poseen un 61% de homogeneidad DNA-DNA, aunque algunos autores aún utilizan esta nomenclatura (Sugumar y col. 1998, Gomez-León y col. 2005, Montes y col. 2006). *Vibrio splendidus* biotipo I se ha relacionado fenotípicamente y genéticamente con *V. lentus* (Macián y col. 2001, Montes y col. 2003).

En el pasado, *V. splendidus* se ha considerado medioambiental, sin ningún significado patogénico específico. Sin embargo, cepas relacionadas con esta especie se han asociado a mortalidades en un amplio rango de animales marinos: moluscos (Nicolas y col. 1996, Sugumar y col. 1998, Lacoste y col. 2001a, Gay y col. 2004a, Gomez-León y col. 2005, Garnier y col. 2007), peces (Austin y col. 1997, Jensen y col. 2003, Montes y col. 2006), penaeidos (Leano y col. 1998) y pulpo (Farto y col. 2003). Existe controversia sobre su consideración como un organismo oportunista, mutualista o patógeno, debido a la falta de herramientas de diagnóstico para identificar y evaluar su patogenicidad. Se han realizado estudios epidemiológicos de cepas de *V. splendidus* asociados a mortalidades de moluscos como vieira (*Pecten maximus*), almeja (*Ruditapes decussatus*) (Lambert y col. 1998, Gomez-León y col. 2005) y sobre todo distintas especies de ostra (*Crassostrea gigas*, *C. virginica*) (Nicolas y col. 1996, Sugumar y col. 1998, Lacoste y col. 2001a, Waechter y col. 2002, Garnier y col. 2007).

Estudios de genotipado por medio de ribotipado, AFLP o restricción con endonucleasas han demostrado la diversidad genética y la naturaleza polifilética de este grupo (Urakawa y col. 1999b, Macián y col. 2000b, Thompson y col. 2001, Le Roux y col. 2002, Montes y col. 2006). Actualmente existen 9 especies, descritas por métodos genéticos: *V. splendidus*, *V. lentus*, *V. tasmaniensis*, *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. chagasii*, *V. cyclitrophicus*, *V. gigantis* y *V. crassostreae* (Hedlund y Staley 2001, Macián y col. 2001, Thompson y col. 2003a, b, Faury y col. 2004, Le Roux y col. 2005); pero hasta ahora no existe ningún método bioquímico que logre diferenciarlas, debido la gran variabilidad de resultados obtenidos. Además, no se puede descartar la descripción, en un futuro próximo, de nuevas especies dentro de este grupo tan diverso.

Por ejemplo, una cepa patógena para ostras (*C. gigas*), identificada inicialmente como *V. splendidus* biotipo II, fue asignada a la especie *V. chagasii* mediante análisis genético (Thompson y col. 2003b, Le Roux y col. 2004). Para una identificación fiable se requiere la incorporación de técnicas moleculares, hoy reconocidas y recomendadas para la definición de especie (Thompson y col. 2001, Stackerbrandt y col. 2002, 2006).

También se ha demostrado que las secuencias del gen 16S rRNA de estas especies son muy similares (Macián y col. 2001, Hedlund y Staley, 2001, Thompson y col. 2003a, b; Faury y col. 2004). Sólo *V. chagasii* crea una rama separada del resto de las especies descritas (Le Roux y col. 2004). Thompson y col. (2004a) propusieron la utilidad del gen *recA* como marcador filogenético para vibrios. El gen es una proteína multifuncional que contribuye a la recombinación homóloga y reparación del DNA (Cox 2003). Propusieron que cepas de la misma especie tendrían valores de similitud de secuencias superiores al 94%. Dentro de este grupo, algunas especies poseen similitudes entre el 91% y el 94 % (*V. chagasii* y *V. pomeroyi*; *V. pomeroyi*, *V. splendidus* y *V. cylitrophicus*), mientras que otras comparten valores aún mayores, como un 97% entre *V. lentus* y *V. splendidus*.

La técnica de MLSA es la más apropiada para estudiar la biodiversidad dentro de este grupo. Basándose en un conjunto de genes se podrían desarrollar métodos de diagnóstico para identificar especies o subespecies de interés. Además, se debería de avanzar en ensayos en busca de factores de virulencia. Ya que no poseemos ninguna técnica para diferenciar cepas patógenas, la solución reside en los experimentos de infección *in vitro*. Se han realizado numerosos estudios de infección en larvas, con gran reproducibilidad en los resultados (Nicolas y col. 1996, Sugumar y col. 1998). Por otro lado, se han asociado mortalidades de ostra en los meses de verano con el aislamiento de miembros del grupo de *V. splendidus* (Le Roux y col. 2002). En larvas se ha descrito necrosis bacilar causada por *V. splendidus*, con lesiones en el manto, velo y tejidos conectivos, así como una actividad citotóxica que disminuye notablemente la supervivencia de hemocitos (Jeffries, 1982, Gómez-León, 2005). Debido a que muchas cepas son patógenas sólo para determinados estadios de desarrollo, es necesario realizar

inoculaciones en ejemplares adultos para lograr determinar la virulencia de la cepa. Los experimentos en moluscos adultos se han realizado inyectando la bacteria en el músculo aductor (Lacoste y col. 2001a, Le Roux y col. 2002) o en la cavidad paleal (Gay y col. 2004, Gómez-Leon y col. 2005). El problema de estas técnicas es la escasa similitud de la ruta de infección respecto a las condiciones naturales. También se han diseñado experimentos de infección mediante baño para así asemejarse más a la situación natural. En algunos casos se ha logrado demostrar la virulencia de cepas en ostras adultas y larvas de almeja (Waechter y col. 2002, Gómez-León y col. 2005), aunque en otros casos no se ha podido reproducir la mortalidad (Lacoste y col. 2001a). En otro estudio, Lacoste y col. (2001b) sugieren que cambios fisiológicos ocasionados por estrés u hormonas influyen las interacciones hospedador-patógeno e incrementan la vulnerabilidad de juveniles de *C. gigas* a cepas de *V. splendidus*.

Garnier y col. (2007) realizaron un estudio en Francia investigando la mortalidad de la ostra (*C. gigas*) manteniendo los ejemplares en estructuras de cultivo (pochones) situados próximos a la costa para simular lo máximo posible las condiciones naturales. Asociaron los episodios de mortalidad a *V. aestuarianus* y a especies del grupo de *V. splendidus*. Relacionaron las mortalidades no sólo con la subida de las temperaturas, sino también con el debilitamiento de los mecanismos de defensa durante la fase de maduración. Concluyeron que el impacto real de las bacterias patógenas se debe a una interacción de tres elementos: patógeno, medioambiente y estado fisiológico del hospedador, aunque en algunos casos dos elementos no favorables son suficientes para causar mortalidades. Los signos observados en ostras enfermas fueron debilidad en el músculo aductor, necrosis en fibras musculares y atrofia del tracto digestivo.

Como ya se ha mencionado, en la literatura son frecuentes las asociaciones de *V. splendidus* con brotes de mortalidades en bivalvos, aunque su patogénesis todavía no se ha definido con exactitud. Es necesario profundizar en la diferenciación de especies dentro de este grupo, para definir con mayor exactitud su taxonomía y búsqueda de posibles patógenos; así como la búsqueda de factores de virulencia mediante estudios *in vitro*.



#### **5.1.5. Especies del clado *Aliivibrio fischeri*.**

Desde los años 70 hasta hoy no se ha podido establecer claramente la posición taxonómica del grupo *Vibrio fischeri*, situado entre los géneros *Vibrio* y *Photobacterium* (Reichelt y Baumann 1973, Baumann y Baumann 1977, Baumann y col. 1980, Thyssen y Ollevier 2005). Un estudio reciente de Urbanzyk y col. (2007) demostró su diferenciación filogenética y fenotípica respecto a otros géneros de la familia *Vibrionaceae*, proponiendo el nuevo género *Aliivibrio*. El género consta de cuatro especies: *Aliivibrio fischeri* y tres especies extremófilas, *A. salmonicida*, *A. wodanis* y *A. logei*.

*Aliivibrio fischeri*, originalmente descrita como *Vibrio fischeri* por Beijerinck y col. en 1889 (citado en Urbanzyk y col. 2007) se conoce por su simbiosis con órganos de luminiscencia en el calamar hawaiano *Euprymna scolopes*. La colonización de *A. fischeri* resulta en bioluminiscencia, que el calamar utiliza como un mecanismo antipredador. Esta asociación simbiótica tiene un origen ancestral, y es resultado de una coevolución en la cual el hospedador y la bacteria se han especializado probablemente adaptando la composición y regulación de muchos genes. Este tipo de simbiosis *A. fischeri*-*E. scolopes* puede monitorizarse en el laboratorio y es un modelo idóneo para estudios de adherencia, regulación, señalización, colonización, evolución o fisiología, con el objetivo de profundizar en las relaciones entre especies de *Vibrio* y hospedadores marinos.

En la mayoría de los miembros de la familia *Vibrionaceae* se conoce la presencia de dos cromosomas, el grande posee muchos genes “housekeeping” conservados, mientras que el pequeño es variable entre especies, pudiendo tener genes más específicos para la función simbiótica.

Muchas especies de los géneros *Sepiola* y *Euprymna* poseen órganos de luz, y los simbiontes luminiscentes son *A. fischeri* o *A. logei*, su congénere psicrófilo. Aunque muchas otras bacterias se adhieren a la superficie de dichos órganos, *A. fischeri* las desplaza. En los extremos de los tentáculos de calamares adultos hay gran variedad de

nutrientes como aminoácidos, péptidos, proteínas o carbohidratos útiles para el crecimiento de la bacteria simbiote. Pero el calamar ha de mantener controlada la población bacteriana mediante barreras entre células epiteliales, mecanismos anti-microbianos (macrófagos) (Nyholm y McFall-Ngai 1998) y control de la disponibilidad de algunos nutrientes como el hierro, o iones como el  $Mg^{2+}$ , necesarios para la movilidad de la bacteria (Graf y Ruby 2000, O'Shea y col. 2005).

Dentro de los *Vibrios* extremófilos están los psicrófilos, con temperatura óptima de crecimiento  $<15^{\circ}C$ , que pueden crecer a  $0^{\circ}C$  o a menor temperatura y a un máximo de  $20^{\circ}C$ , y los psicrotolerantes cuya temperatura óptima de crecimiento es  $>20^{\circ}C$  pero que también pueden crecer cerca de  $0^{\circ}C$  (Russel y Hamamoto 1998, Bartlett 2006).

*Aliivibrio salmonicida* (psicrófila) y *A. wodanis* (psicrotolerante) son dos especies extremófilas asociadas a enfermedades en el salmón atlántico (*Salmo salar*) en aguas frías. *Aliivibrio salmonicida* fue descrita por Egidius y col. (1986) y es responsable de la enfermedad conocida como la vibriosis de agua fría (Colquhoun y Sorum 2001) o enfermedad de Hitra (Egidius y col. 1981), lugar donde se aisló la bacteria por primera vez. La bacteria es poco reactiva, móvil, luminiscente y de crecimiento lento a su temperatura óptima de  $10^{\circ}C$  (Colquhoun y col. 2002). La enfermedad se caracteriza por anemia y hemorragias en el abdomen, tracto digestivo y vejiga natatoria. Se ha logrado controlar mediante vacunas formolizadas y adyuvantadas. *Aliivibrio wodanis*, descrita por Lunder y col. (2000), es una especie oportunista que impide la cicatrización de úlceras producidas principalmente por la especie *Moritella viscosa* (Benediktsdottir y col. 2000), que se ha asociado con la enfermedad de la úlcera de invierno (Lunder y col. 1995).

Finalmente, la especie *A. logei* comparte características con *A. fischeri* y las dos especies de aguas frías mencionadas. Es bioluminiscente, posee la capacidad de asociarse con salmónidos a bajas temperaturas causando la vibriosis de agua fría, pero también puede residir en órganos de luz en especies de calamar. A bajas temperaturas es el simbiote dominante (Benediktsdottir y col. 1998) mientras que a temperaturas

mayores de 26°C es desplazada por *A. fischeri* (Fidopiastis y col. 1998, Nishiguchi, 2000).

Este grupo de bacterias psicrófilas o psicrotolerantes poseen varias características resultado de la adaptación. Un grupo de proteínas, la familia CspA (Cold shock nucleic acid-binding proteins), inducidas por bajas temperaturas, se adhieren a ácidos nucleicos, reducen la estructura secundaria y actúan como chaperonas de ácidos nucleicos facilitando la transcripción y la translocación a bajas temperaturas (Phadtare y col. 2004). La composición de ácidos grasos en los lípidos de la membrana citoplasmática cambia a bajas temperaturas, con un mayor número de ácidos grasos insaturados. Y finalmente las enzimas de especies psicrófilas son más sensibles al calor que en especies mesófilas (Barlett y col. 2006). En respuesta a condiciones extremas a bajas temperaturas hay bacterias, como *A. salmonicida*, que entran en un estado fisiológico en el cual no son capaces de crecer en medios sólidos, pero sí mantienen su metabolismo activo, es el estado denominado viable no cultivable (VNC).

Se han apreciado efectos muy diferentes en especies del género *Aliivibrio*, desde una coevolución simbiótica a patogenicidad. El aislamiento y caracterización de nuevas especies dentro de este género sería de gran importancia y utilidad para el estudio de los factores que resultan en la diversidad genética y especialización.

En el capítulo anterior un total de 145 vibrios, representativos de los grupos fenotípicos descritos en el capítulo 3, se analizaron mediante la técnica de AFLP. Se confirmó que los aislados pertenecían a la familia *Vibrionaceae* pero un gran número de ellos no pudieron ser identificados a nivel de especie, por tanto se consideró la posibilidad de que algunos de ellos representaran nuevas especies. Se observaron tres líneas filogenéticas diferentes en los árboles obtenidos con el gen 16S rRNA y tres genes “housekeeping”, que representan a los clusters de AFLP 48, 37 y 86. En este capítulo se profundiza en las posiciones taxonómicas de estos tres grupos de bacterias similares a los tres grupos de vibrios descritos en esta introducción. Se presenta una caracterización

fenotípica completa y un análisis filogenético que demuestra que los tres grupos de bacterias representan nuevas especies dentro de los géneros *Vibrio* y *Aliivibrio*.

## 5.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 5.2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

En este estudio se utilizaron un total de 14 aislados (7 del cluster 37, 4 del cluster 86 y 3 del cluster 48) procedentes de almejas cultivadas (*R. philippinarum* y *R. decussatus*). Las cepas de referencia incluidas en el estudio se obtuvieron de colecciones de cultivo: *Vibrio comitans* LMG 23416<sup>T</sup>, *V. rarus* LMG 23674<sup>T</sup>, *V. inusitatus* LMG 23434<sup>T</sup>, *V. ezurae* DSM 17533<sup>T</sup>, *V. neonatus* DSM 17531<sup>T</sup>, *V. halioticoli* IAM 14596<sup>T</sup>, *V. gallicus* DSM 16639<sup>T</sup>, *V. superstes* DSM 16383<sup>T</sup>, *V. lentus* ATCC 33125<sup>T</sup>, *V. gigantis* DSM 18531<sup>T</sup>, *V. crassostreae* LMG 2240<sup>T</sup>, *V. splendidus* II CECT 528<sup>T</sup>, *V. pomeroyi* LMG 20537<sup>T</sup>; *V. tasmaniensis* LMG 21574<sup>T</sup>, *V. kanaloae* DSM 17181<sup>T</sup>, *V. chagasii* DSM 17138<sup>T</sup>, *V. cyclitrophicus* LMG 21359<sup>T</sup>, *Aliivibrio. fischeri* NCMB 1281<sup>T</sup>, *A. logei* NCIMB 1143 y *A. salmonicida* NCIMB 2262<sup>T</sup>.

Todas las cepas se sembraron en AM y se incubaron a una temperatura de 24±1°C, con excepción de *A. salmonicida* que se incubó a 15°C, y se conservaron ultracongeladas a -80°C en Caldo Marino con glicerol (15% v/v).

### 5.2.2. Caracterización fenotípica.

#### 5.2.2.1. Metodología clásica.

El estudio de las características fisiológicas y bioquímicas se realizó mediante una caracterización fenotípica siguiendo los protocolos clásicos descritos en West y col. (1986), Romalde y col (1990) y Mac Faddin (1993). La temperatura de incubación fue de 24±1°C. Además de los tests descritos en el Capítulo 3 de esta memoria, se realizaron las siguientes pruebas:

- La ureasa mediante el medio urea (KH<sub>2</sub> 9,1g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9,5g/l, urea [pureza 20%] 20g/l, rojo fenol 0,001g/l).

- La producción de ácido de los azúcares sacarosa, manitol e inositol al 1% en el medio Leifson.
- Sensibilidad a la ampicilina (10 µg, AM10) en placas de Agar Müeller-Hinton (Oxoid) al 1% de NaCl (MHA-1) con discos comerciales (Oxoid).
- Hidrólisis del DNA en placas de Agar DNasa (Difco). El revelado se realizó con HCl 1M.
- La actividad alginasa en placas de AM suplementado con alginato sódico al 1%, revelado con HCl 1M.
- La actividad hemolítica en placas de Agar Sangre (Oxoid).

#### *5.2.2.2. Sistemas miniaturizados.*

##### API 20E y API ZYM (BioMérieux)

El API 20E es un sistema de identificación para bacterias de origen clínico (Enterobacterias y otras Gram negativas no exigentes) miniaturizado y estandarizado. El API ZYM es un método semicuantitativo de determinación de actividades enzimáticas con 20 cúpulas que contienen un sustrato enzimático con un tampón. Se utilizaron ambos sistemas siguiendo las instrucciones del fabricante, exceptuando el uso de solución salina (SS: NaCl 0,85%) para realizar los inóculos y la incubación a una temperatura de  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Se realizaron suspensiones ajustando la concentración con un espectrofotómetro Spectronic 20D (Milton Roy Co.) a una densidad óptica de 1,0 a una longitud de onda de 580 nm. La lectura de los resultados se realizó a las 24 h.

##### API 50CH

El sistema API 50CH (BioMérieux) permite realizar el estudio del metabolismo bacteriano de hidratos de carbono y derivados (polialcoholes, ácidos urónicos y heterósidos). Está compuesto por 50 micro-cápsulas con una cúpula que se puede emplear como zona de aerobiosis para estudios de oxidación y asimilación, o sellada con parafina para realizar estudios de fermentación. El sistema se utilizó para la fermentación de los substratos, detectándose mediante un cambio de color en la microcápsula debido a una producción de ácido en anaerobiosis. En lugar de utilizar el medio comercial API 50 CHB/E recomendado por el fabricante, se empleó como base

el medio de inoculación ZOF (Lemos y col. 1985) modificado eliminando el agar y aumentando la concentración del colorante (Prado 2006). Se prepararon los inóculos en SS a la densidad deseada mediante espectofotometría, tal y como se describe para los API 20E y API ZYM. Se realizaron lecturas después de 24, 48, 96 y 120 h. Los resultados finales se obtuvieron después de 6 días de incubación.

### 5.2.3. Microscopía electrónica.

La visualización de las células bacterianas se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM).

Para la visualización de las cepas mediante TEM se aplicó una gota de suspensión bacteriana en SS en una rejilla (400 mesh) cubierta con una película de Formvar (SPI Supplies). Se retiró el exceso de muestra y se lavó con agua miliQ para eliminar el exceso de sales. La rejilla se dejó secar durante 15 min y posteriormente se realizó la tinción mediante ácido fosfotúngstico al 2% con un lavado posterior con agua miliQ. Las muestras procesadas se visualizaron mediante un microscopio electrónico de transmisión Philips CM-12.

Para la visualización mediante SEM, se preparó una suspensión bacteriana en SS de aproximadamente  $10^9$  bac/ml. La fijación se realizó con glutaraldehído al 1%. Las células fijadas se filtraron por filtros Anodisc 25 de  $0,2\mu\text{m}$ , se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) y se procedió a la deshidratación de las células mediante lavados

Gen	Producto	Cebador	Secuencia 5' → 3'	Posición
pyrH	Urilata kinasa (750nt)	pyrH-02-R	gtraabgcngmyarrtcca	599
		pyrH-04-R	atgasnacbaayccwaaacc	1

sucesivos a concentraciones crecientes de etanol (30%, 50%, 70% 90% y 100%). La tinción de las células se realizó mediante acetato de uranilo (2%) durante aproximadamente 1 h. El filtro se lavó en etanol al 100% en pocillos estériles (Nunc), y se añadió una gota sobre el portaobjetos especial para microscopía electrónica de barrido. Las muestras procesadas se visualizaron en un microscopio electrónico de barrido LEICA 440 (LEICA Microsystems, Cambridge, UK).

#### **5.2.4. Amplificación del DNA y secuenciación.**

Las reacciones de secuenciación del gen 16S rRNA y los genes “housekeeping” *rpoA*, *recA* y *atpA*, así como los análisis filogenéticos se realizaron según los protocolos descritos en el apartado 4.2.4.2. de esta memoria. También se realizó la secuenciación del gen *pyrH* (443 pb), las posiciones de los cebadores se muestran en la Tabla 5.1.

El gen 16S rRNA se secuenció para un total de 5 cepas del cluster 37, 3 del cluster 48 y 4 del cluster 86. Los genes “housekeeping” se secuenciaron un total de 3 aislados del cluster 37, 2 del cluster 48 y 3 del cluster 86.

Debido a la ausencia de un número de secuencias de cepas tipo en la base de datos se secuenciaron las siguientes cepas tipo:

- Gen *pyrH*: *V. comitans* LMG 23416<sup>T</sup>, *V. rarus* LMG 23674<sup>T</sup>, *V. inusitatus* LMG 23434<sup>T</sup>, *V. gallicus* LMG 21330<sup>T</sup>, *V. superstes* LMG 21323<sup>T</sup>, *V. ezurae* DSM 17533<sup>T</sup>, *V. neonatus* DSM 17531<sup>T</sup>, *V. haliotocoli* IAM 14596<sup>T</sup>, *V. gigantis* DSM 18531<sup>T</sup>, *V. crassostreae* LMG 22240<sup>T</sup>, *V. cyclitrophicus* LMG 21359<sup>T</sup>, *V. pomeroyi* LMG 20537<sup>T</sup>, *V. lentus* CECT 5110<sup>T</sup>, *V. pelagius* NCIMB 1900<sup>T</sup>, *V. splendidus* ATCC 33125<sup>T</sup>, *V. tasmaniensis* LMG 21574<sup>T</sup> y *A. logei* NCIMB 1143.

**Tabla 5.1.** Cebadores de amplificación y secuenciación del gen *pyrH* (Thompson y col. 2005).

#### **5.2.5. Determinación del contenido Guanina + Citosina e hibridación DNA-DNA.**

La determinación del contenido guanina + citosina (G + C) y la hibridación DNA-DNA de la cepa RD 15.11<sup>T</sup> (= CECT 7222<sup>T</sup> = LMG 23858<sup>T</sup>) se realizaron en el servicio de

identificación de la Colección Belga de Cepas Tipo en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Gante (BCCM<sup>TM</sup>/LMG, Belgian Coordinated Collections of Microorganisms/Laboratorium voor Microbiologie from Universiteit Gent). El DNA se preparó mediante una modificación del método de Wilson y col. (1987) (Cleenwerck y col. 2002). Las hibridaciones DNA-DNA se realizaron a 39°C mediante una modificación de Goris y col. (1998) del método descrito por Ezaki y col. (1989). La cepa RD 15.11<sup>T</sup> se hibridó con las especies más cercanas, *V. superstes* LMG 21323<sup>T</sup>, *V. comitans* LMG 23416<sup>T</sup>, *V. inusitatus* LMG 23434<sup>T</sup>, *V. neonatus* LMG 19973<sup>T</sup>, *V. rarus* LMG 23674<sup>T</sup> y *V. halioticoli* LMG 18542<sup>T</sup>. El contenido G+C de la cepa RD 15.11<sup>T</sup> se determinó mediante el método de Mesbah y col. (1989).

**5.2.6. Espectrometría de masas: MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry).**

El análisis de proteínas para una identificación taxonómica bacteriana se realizó por Espectrometría de Masas que utiliza como método de Ionización la Desorción Láser asistida por Matriz y un analizador de Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF-MS) en la Unidad de Masas de los servicios generales de la Universidad de Santiago de Compostela. La extracción se realizó con etanol, ácido fórmico y acetonitrilo (AN). Las muestras procesadas se colocaron en una placa multipocillo, se dejaron secar y se cubrieron con una solución matriz (solución saturada de  $\alpha$ -HCCA en AN al 50% y ácido acético tri-fluor (TFA) al 2,5%). Las muestras procesadas se dejaron secar al aire. El análisis se realizó con un equipo MALDI-TOF-MS modelo AUTOFLEX (Bruker). Los perfiles de proteínas se compararon con la base de datos de la casa comercial Bruker.

Cada cepa se evaluó 15 veces. Se incluyó la cepa de *Escherichia coli* FV9180 como control. El rango de valores para la diferenciación a nivel de especie se muestra en la Tabla 5.2.



**Tabla 5.2.** Significado de los valores del MALDI-TOF-MS.

<b>Rango valor logarítmico</b>	<b>Descripción</b>
2,300-3,000	Buena identificación a nivel de especie.
2,000-2,299	Identificación a nivel de género segura, identificación a nivel de especie dudosa.
1,700-1,999	Identificación a nivel de género.
0,000-1,699	Identificación no fiable.

#### **5.2.7. *ERIC* y *REP-PCR*.**

Para profundizar en el estudio de la diversidad genética intraespecífica de los grupos de bacterias analizados, se realizaron los ensayos de *ERIC* y *REP-PCR* siguiendo los protocolos descritos en el apartado 4.2.5.

### **5.3. RESULTADOS.**

#### **5.3.1. *Vibrio breoganii* sp. nov.**

##### *5.3.1.1. Caracterización fenotípica.*

##### Metodología clásica.

Las cepas RD 15.11<sup>T</sup>, VB 16.3, C 5.5, RD2G5, RD2B2, C 4.15 y CMJ 13.7 forman el cluster de AFLP 37. Comparten las características fenotípicas del género *Vibrio* a excepción de la presencia de flagelo (Farmer y col. 1992). Son anaerobias facultativas, inmóviles, Gram negativas y oxidasa positivas. Necesitan NaCl para crecer, crecen en TCBS, son sensibles al agente vibriostático O/129 (150 µg/disco) y reducen nitratos a nitritos. Son negativas para las pruebas arginina dihidrolasa, lisina y ornitina decarboxilasa, urea, indol, VP, citrato, gelatinasa, lipasa, hidrólisis de almidón y actividad DNasa. Hidrolizan la esculina y utilizan alginato. No producen gas pero sí acidifican la glucosa. Crecen a 4°C y al 6% de NaCl, pero no a 37°C ni a concentraciones de NaCl menores que el 0,5% ni mayores que el 8%. Son sacarosa

negativas y resistentes a la ampicilina, a excepción de un aislado en cada prueba (RD2G5 y C5.5, respectivamente).

### Sistemas miniaturizados.

En la Figura 5.2 se muestran los resultados para la cepa tipo RD 15.11<sup>T</sup> de los sistemas API 20E y API ZYM. Los perfiles de las 7 cepas obtenidos en el API 20E fueron homogéneos a excepción de dos pruebas, la sacarosa que es positiva sólo en la cepa RD2G5, y la D-melibiosa que es positiva en dos (RD 15.11<sup>T</sup> y CMJ 13.7). Las reacciones positivas fueron la  $\beta$ -galactosidasa (ONPG) y la producción de ácido de la glucosa, manitol y amigdalina. Los resultados del API 20E concuerdan con los obtenidos en tubo y placa.

En el caso del sistema API ZYM los resultados también fueron homogéneos. Las actividades enzimáticas positivas en todas las cepas fueron fosfatasa alcalina, esterasa, esterasa lipasa (negativa sólo para la cepa C5.5), leucina arilamidasa, fosfatasa ácida, Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa y N-acetil-  $\beta$ -glucosaminidasa.

Según los resultados obtenidos con la galería API 50CH incubada en anaerobiosis (Tabla 5.3), los siete aislados fermentan D-xilosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manitol, N-ac-glucosamina, amigdalina, esculina, salicina, D-celobiosa, D-maltosa, almidón, gentiobiosa, gluconato potásico y 2-cetogluconato potásico. La cepa tipo RD15.11<sup>T</sup> es la única capaz de fermentar L-xilosa y D-lactosa (Figura 5.3).

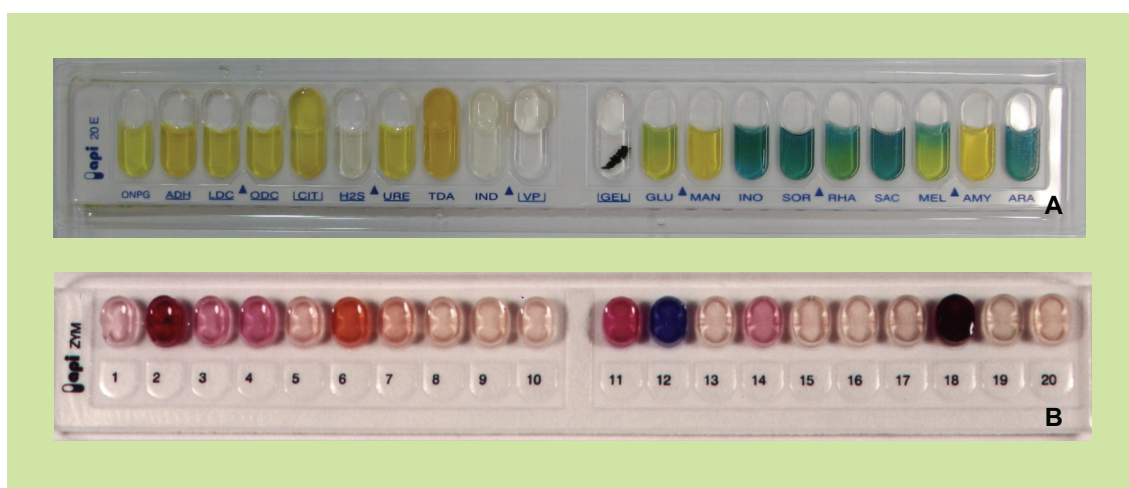
Un resumen de las pruebas con resultados variables obtenidos tanto por métodos clásicos como en sistemas miniaturizados se muestran en la Tabla 5.4.

#### *5.3.1.2. Diferenciación fenotípica de especies cercanas.*

La especie nueva posee las principales características fenotípicas del género *Vibrio*, pero hay también algunas pruebas que son útiles para diferenciarla de otras especies cercanas (Tabla 5.5). La especie *V. superstes* no crece a 4°C ni al 6% de NaCl, es negativa para la prueba  $\beta$ -galactosidasa y fermenta D-trehalosa, al contrario que *V. breoganii*. Los resultados del API ZYM confirman otras diferencias, como el uso de



esterasa (C4) y naftol-AS-BI-fosfohidrolasa. Las pruebas D-galactosa y  $\beta$ -galactosidasa son negativas para *V. inusitatus* y positivas para *V. breoganii*. Se diferencia de *V. rarus* en el crecimiento a 4°C, amigdalina, D-xilosa, D-galactosa,  $\beta$ -galactosidasa, esculina, salicina, indol y fermentación de glicerol. Finalmente *V. rarus*, *V. inusitatus* y *V. comitans* son negativas para las actividades enzimáticas esterasa, esterasa lipasa (C8), fosfatasa ácida y Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa al contrario que *V. breoganii*.



**Figura 5.2.** Resultados de los sistemas miniaturizados para la cepa tipo RD 15.11<sup>T</sup>: (A) API 20E; (B) API ZYM.

#### 5.3.1.3. Microscopía electrónica.

La microscopía electrónica muestra que las células de *V. breoganii* sp. nov. son bacilos pequeños de tamaño variable, en un rango 0,95-1,8  $\mu\text{m}$  de longitud por 0,58-0,65  $\mu\text{m}$  de ancho. Se observó la presencia de cápsula mediante la microscopía de transmisión. No se apreció la presencia de flagelo en ninguna célula ni por microscopía electrónica de barrido ni de transmisión (Figura 5.4).



**Figura 5.3.** Resultados del sistema miniaturizado API50CH de la cepa tipo de *V. breoganii*, RD 15.11<sup>T</sup>.

**Tabla 5.3.** Resultados de producción de ácido de diferentes fuentes de carbono por las 7 cepas *Vibrio breoganii* sp. nov. obtenidos con el sistema miniaturizado API 50CH.

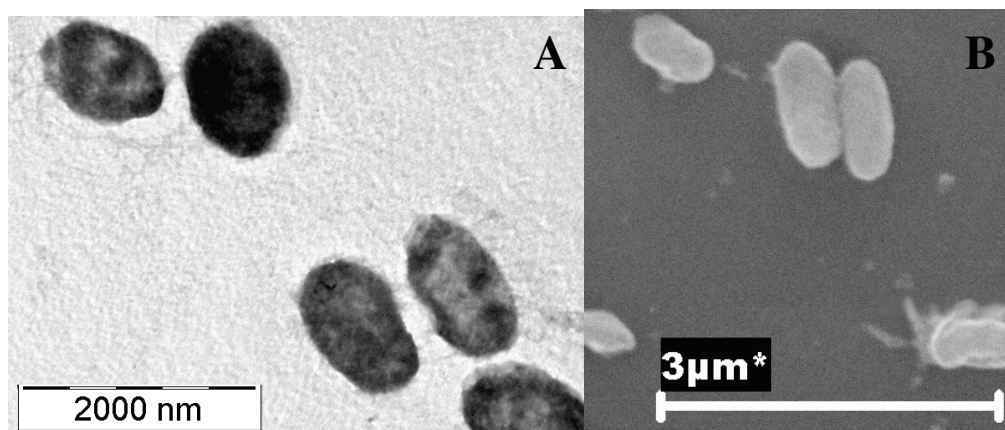
Fuente de carbono		RD 15.11 <sup>T</sup>	C 4.15	RD2B2	RD2G5	VB 16.3	C 5.5	CMJ 13.7
GLY	glicerol	-	-	-	-	-	-	-
ERY	eritritol	-	-	-	-	-	-	-
DARA	D-arabinosa	-	-	-	-	-	-	-
LARA	L-arabinosa	-	-	-	-	-	-	-
RIB	D-ribosa	-	+	-	-	-	+	-
DXYL	D-xilosa	+	+	+	+	+	+	+
LXYL	L-xilosa	+	-	-	-	-	-	-
ADO	D-adonitol	-	-	-	-	-	-	-
MDX	Meti-β-D-xilopiranosida	-	-	-	-	-	-	-
GAL	D-galactosa	+	+	+	+	+	+	+
GLU	D-glucosa	+	+	+	+	+	+	+
FRU	D-fructosa	+	+	+	+	+	+	+
MNE	D-manosa	-	-	-	-	-	-	+
SBE	L-sorbosa	-	-	-	-	-	-	-
RHA	L-ramnosa	-	-	+	+	+	-	+
DUL	dulcitol	-	-	-	-	-	-	-
INO	inositol	-	-	-	-	-	-	-
MAN	D-manitol	+	+	+	+	+	+	+
19 SOR	D-sorbitol	-	-	-	-	-	-	-
MDM	metil-α-D-manopiranosida	-	-	-	-	-	-	-
NDG	metil-α-D-glucopiranosida	-	-	-	-	-	-	-
NAG	N-acetil-glucosamina	+	+	+	+	+	+	+
AMY	amigdalina	+	+	+	+	+	+	+
ARB	arbutina	+	+	-	-	-	+	+
ESC	esculina	+	+	+	+	+	+	+
SAL	salicina	+	+	+	+	+	+	+
CEL	D-celobiosa	+	+	+	+	+	+	+
MAL	D-maltosa	+	+	+	+	+	+	+
LAC	D-lactosa	+	-	-	-	-	-	-
MEL	D-melibiosa	+	-	-	-	-	-	+
SAC	D-sacarosa	-	-	-	+	-	-	-
TRE	D-trealosa	-	-	-	-	-	-	-
INU	inulina	-	-	-	-	-	-	-
MLZ	D-melezitosa	-	-	-	-	-	-	-
RAF	D-rafinosa	-	-	-	-	-	-	-
AMD	almidón	+	+	+	+	+	+	+
GLYG	glucógeno	+	+	+	+	+	-	-
XLT	xilitol	-	-	-	-	-	-	-
GEN	gentiobiosa	+	+	+	+	+	+	+
TUR	D-turanosa	-	-	-	-	-	-	-
LYX	D-lixosa	-	-	-	-	-	-	-
TAG	D-tagatosa	-	-	-	-	-	-	-
DFUC	D-fucosa	-	-	-	-	-	-	-
LFUC	L-fucosa	-	-	-	-	-	-	-
DARL	D-arabitol	-	-	-	-	-	-	-
LARL	L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-
GNT	gluconato potásico	+	+	+	+	+	+	+
2KG	2-cetogluconato potásico	+	+	+	+	+	+	+
5KG	5-cetogluconato potásico	-	-	-	-	-	-	-



**Tabla 5.4.** Características fenotípicas variables para las cepas *V. breoganii* sp. nov.

Prueba	RD 15.11 <sup>T</sup>	C 4.15	CMJ 13.7	RD 2B2	VB 16.3	RD 2G5	C 5.5
Ampicilina (10µg/disc)	S*	S	S	S	S	S	R
Esterasa lipasa	+	+	+	+	+	+	-
<u>Producción de ácido de</u>							
Sacarosa	-	-	-	-	-	+	-
D-manosa	-	-	+	-	-	-	-
D-ribosa	-	+	-	-	-	-	+
D-melibiosa	+	-	+	-	-	-	-
L-ramnosa	-	-	+	+	+	+	-
Arbutina	+	+	+	-	+	-	+
Glucógeno	+	+	-	+	+	+	-
L-xilosa	+	-	-	+	-	-	-
D-lactosa	+	-	-	-	-	-	-

\*S, sensible; R, resistente.



**Figura 5.4.** (A) Fotografía electrónica de transmisión de la cepa tipo de *V. breoganii* RD 15.11<sup>T</sup>. (B) Fotografía electrónica de barrido de la cepa tipo de *V. breoganii* RD 15.11<sup>T</sup>.

**Tabla 5.5.** Características fenotípicas diferenciales de la nueva especie *Vibrio Aveogrewii* de especies de *Vibrio* cercanas (datos de obtenidos en el laboratorio). Especies: 1, *V. Aveogrewii* (7 cepas); 2, *V. coriarius* LMG 23416T; 3, *V. anguillarum* LMG 23434T; 4, *V. anguillarum* LMG 23674T; 5, *V. anguillarum* LMG 23674T; 6, *V. anguillarum* DSM 17533T; 7, *V. anguillarum* LMG 14596T; 8, *V. anguillarum* LMG 21330T; 9, *V. anguillarum* LMG 21323T. Y +, variable pero la cepa tipo positiva (número de cepas positivas en paréntesis); V -, variable pero la cepa tipo es negativa (número de cepas positivas en paréntesis). Todas las especies son fermentativas, sensibles al agente vibriostático 0/129 (150 µg), inmóviles, positivas para la oxidasa, catalasa, requerimiento de Na+ para crecer, reducción de nitratos, crecimiento al 3% NaCl, crecimiento a 15-30°C, crecimiento en TCBS, producción de alginasa y fermentación de D-glucosa y D-maniol; son negativas para la pigmentación, "swarming", crecimiento a 37°C y al 0.5% NaCl, producción de gas a partir de glucosa, arginina, dihidroclasa, lisina y ornitina decarboxilasas, luminiscencia, hidrólisis del agar, producción de amilasa, gelatinasa, lipasa, fermentación de D-sorbitol, L-arabinosa e inositol.

Característica	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Indol	-	-	-	+	+	+	+	+	-
β-galactosidasa (ONPG)	+	+	-	-	-	-	+	-	-
<b>Fermentación de:</b>									
Amigdalina	+	+	+	-	+	-	-	-	+
Glicerol	-	-	-	+	-	-	+	-	-
D-ribosa	V-(2)	-	-	-	-	-	+	+	+
D-xilosa	+	+	+	-	-	-	-	-	+
D-galactosa	+	+	+	-	-	+	-	-	+
Esculina	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Salicina	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Celobiosa	+	+	+	+	+	-	-	-	+
D-trehalosa	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Gentiobiosa	+	+	+	+	+	-	-	-	+
<b>Crecimiento a:</b>									
4°C	+	+	+	-	-	-	-	-	-
6% NaCl	+	+	+	+	-	-	-	-	-
DNasa	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>API ZYM.</b>									
Esterasa (C4)	+	-	-	-	-	+	-	+	-
Esterasa lipasa (C8)	V+(6)	-	-	-	-	+	-	+	-
Fosfatasa ácida	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Naftol-AS-BI-fosfotidrolasa	+	-	-	-	-	-	-	-	-



5.3.1.4. *Análisis filogenético.*

Gen 16S rRNA.

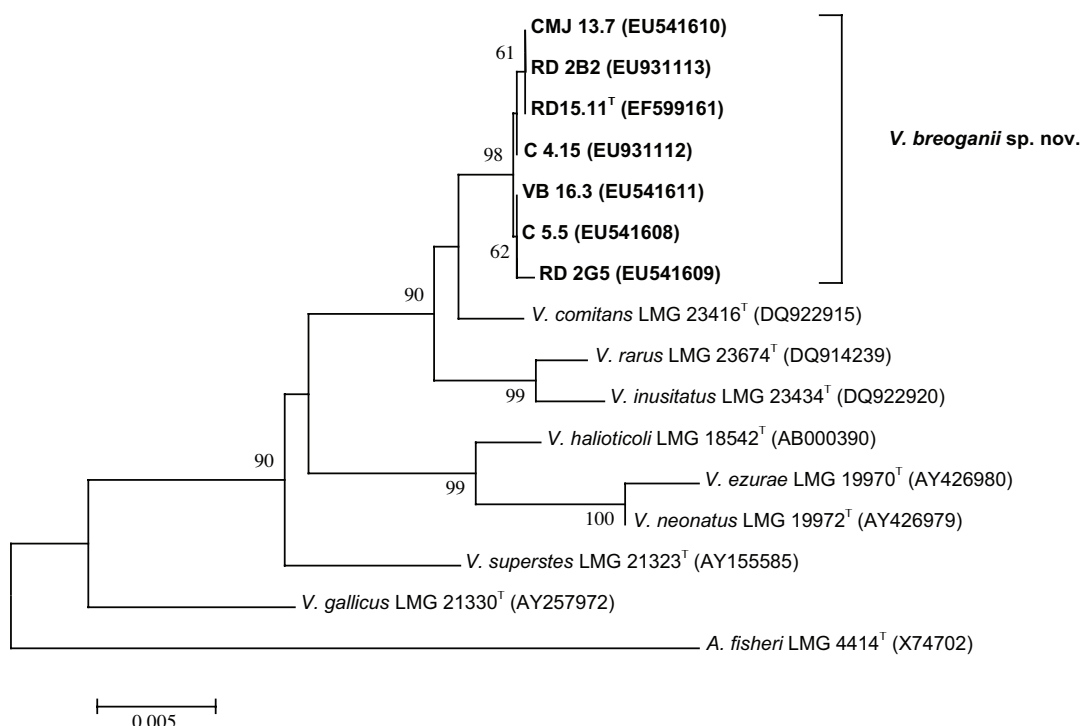
Los resultados del análisis filogenético basado en el gen 16S rRNA demuestran claramente que las 7 cepas de *V. breoganii* pertenecen al subgrupo 3 de las  $\gamma$  *Proteobacterias*. Los aislados poseen un valor de similitud entre ellos para el gen 16S rRNA mayor del 99,9%. También se obtienen valores altos con especies cercanas, en un rango entre 99,4% (RD 15.11<sup>T</sup> y *V. comitans* LMG 23416<sup>T</sup>) y 97,0% (RD 15.11<sup>T</sup> y *V. neonatus* HDD3-1<sup>T</sup>) (Tabla 5.6). La elevada similitud en el gen 16S rRNA, así como en las características fenotípicas entre la nueva especie y *V. comitans*, dificulta su diferenciación. De hecho, los valores de similitud son superiores al límite de variabilidad intraspecífica (98,7%) propuesto por Stackebrandt y Ebbers (2006), por lo que el estudio de la secuencia del gen 16S rRNA es insuficiente para establecer de forma concluyente las especies *V. comitans*, *V. inusitatus*, *V. rarus* y *V. breoganii*. Sin embargo, tal y como se observa en el árbol filogenético, los aislados de *V. breoganii* forman un grupo definido con valores de “bootstrap” del 95% (Figura 5.5). Las secuencias de las cepas de *V. breoganii* están depositadas en el GenBank con los números de acceso que se recogen en el árbol (Figura 5.4).

Genes “housekeeping”.

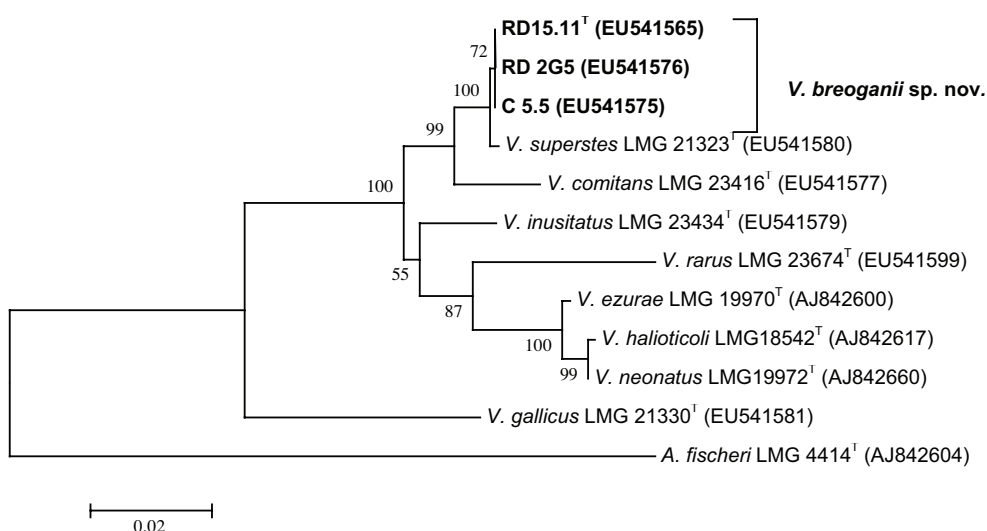
La Tabla 5.6 muestra los porcentajes de similitud de la cepa tipo de *V. breoganii* con vibrios cercanos para todos los genes estudiados.

***rpoA***

El árbol filogenético basado en secuencias del gen *rpoA* muestra la imposibilidad de diferenciar mediante este gen las especies *V. superstes* y *V. breoganii* (valor de “bootstrap” 100%) (Figura 5.6). Los valores de similitud oscilan entre 99,8% (RD 15.11<sup>T</sup> y *V. superstes* LMG 21323<sup>T</sup>) y 92,0% (RD 15.11<sup>T</sup> y *V. gallicus* LMG 21330<sup>T</sup>).



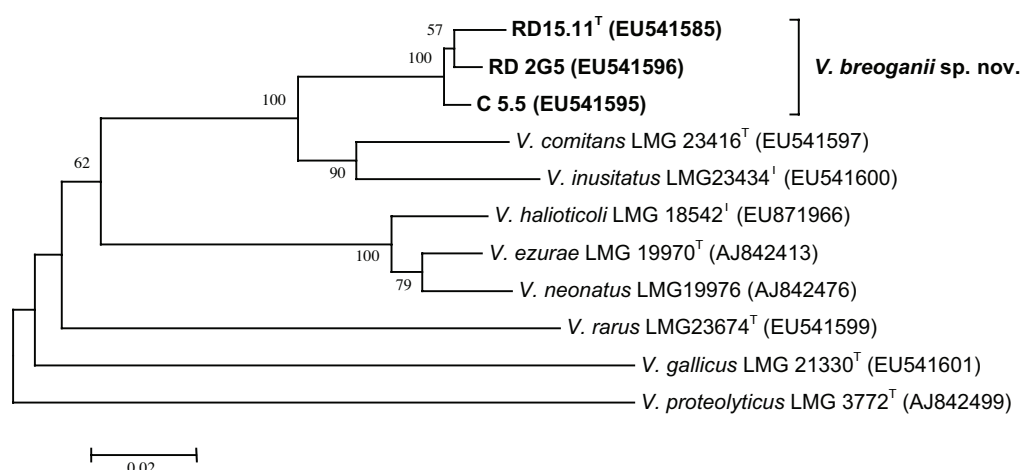
**Figura. 5.5.** Árbol filogenético construido con las secuencias del gen 16S rRNA de 5 cepas de *V. breoganii*, y de las especies más próximas. Se utiliza como “outgroup” *Aliivibrio fischeri*. La longitud de las ramas horizontales es proporcional a la divergencia evolutiva. Los valores de “bootstrap” (>50%) de 1000 réplicas aparecen próximos a la rama correspondiente.



**Figura. 5.6.** Árbol filogenético construido con secuencias del gen *rpoA* de 3 cepas de *V. breoganii*, y especies más próximas. Características igual que en la Figura 5.5.

### *recA*

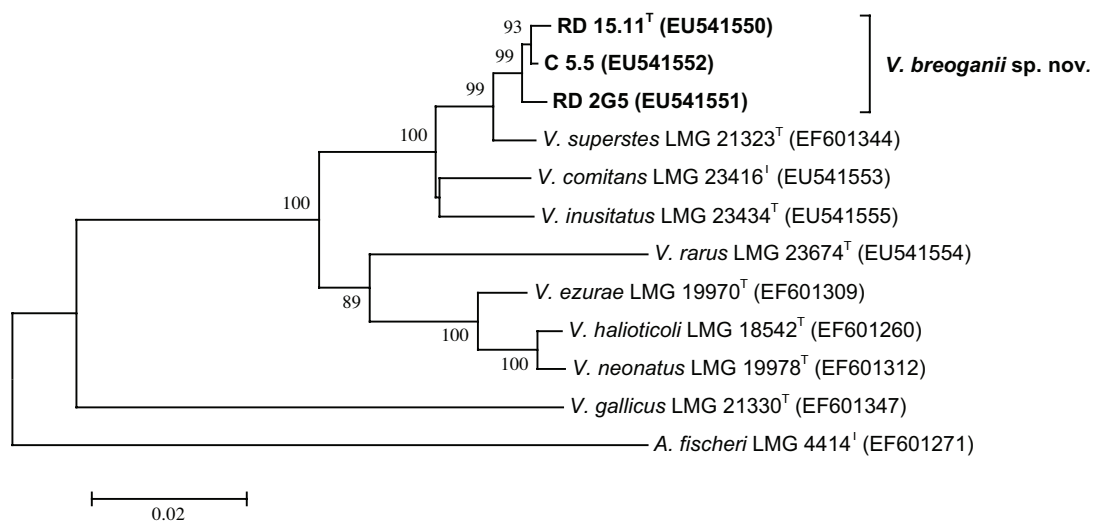
El máximo valor de similitud entre *V. breoganii* y las especies más cercanas filogenéticamente es de 93% (RD 15.11<sup>T</sup> y *V. comitans* LMG 23416<sup>T</sup>) y el mínimo de 82% (RD 15.11<sup>T</sup> y *V. gallicus* LMG 21330<sup>T</sup>). El árbol filogenético del gen *recA* agrupa las 3 cepas de *V. breoganii* (RD 15.11<sup>T</sup>, RD2G5, C5.5) con valores de “bootstrap” del 100%, diferenciándolas del resto de los vibrios cercanos (Figura 5.7). Fue imposible obtener una amplificación para este gen de *V. superstes*, un dato importante ya que es una de las especies más cercanas a *V. breoganii*.



**Figura. 5.7.** Árbol filogenético construido secuencias del gen *recA* de 3 cepas de *V. breoganii*, y de especies más próximas. Se utiliza como “outgroup” *Vibrio proteolyticus*. Características igual que en la Figura 5.5.

### *atpA*

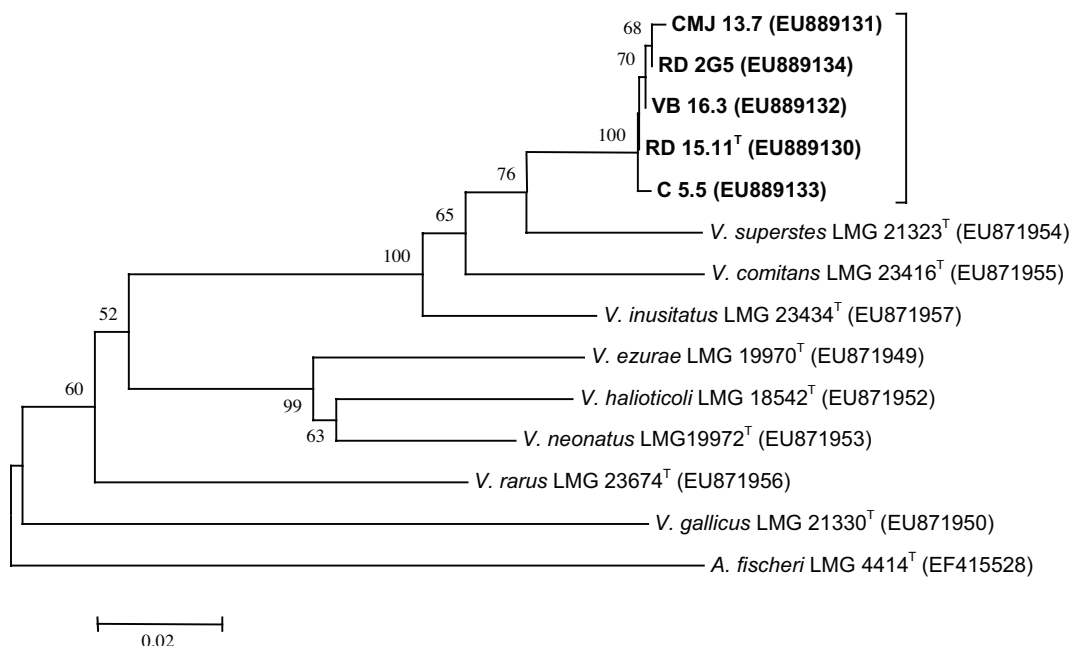
El árbol filogenético del gen *atpA* también confirmó el agrupamiento de las cepas de *V. breoganii* con valores de “bootstrap” de 99%, diferenciándolas del resto de las especies de *Vibrio* (Figura 5.8). En este caso los valores de similitud oscilan entre 98,4% (RD 15.11<sup>T</sup> y *V. superstes* LMG21323<sup>T</sup>) y 88,5% (RD 15.11<sup>T</sup> y *V. gallicus* LMG 21330<sup>T</sup>).



**Figura. 5.8.** Árbol filogenético construido con secuencias del gen *atpA* de 3 cepas de *V. breoganii*, y de especies más próximas. Características igual que en la Figura 5.5.

### *pyrH*

Como en los casos anteriores, el árbol filogenético del gen *pyrH* confirmó el agrupamiento de 5 cepas de *V. breoganii* con valores de “bootstrap” de 100% (Figura 5.9). La ausencia de secuencias de este gen depositadas en el GenBank obligó a secuenciar todas las cepas tipo de las especies más cercanas. El valor de similitud más alto fue 95,0% con *V. superstes* y el más bajo 82,0% con *V. gallicus*.



**Figura. 5.9.** Árbol filogenético construido con secuencias del gen *pyrH* de 5 cepas de *V. breoganii*, y de especies más próximas. Características igual que en la Figura 5.5.

**Tabla 5.6.** Resultados de similitud (%) de las secuencias de los genes 16S rRNA, *recA*, *rpoA*, *atpA* y *pyrH* de la cepa RD 15.11<sup>T</sup> y las especies de *Vibrio* más cercanas.

Cepas tipo	16S	<i>recA</i>	RD 15.11 <sup>T</sup>		
			<i>rpoA</i>	<i>atpA</i>	<i>pyrH</i>
<i>V. comitans</i> LMG 23416 <sup>T</sup>	99,4	93,0	99,8	97,4	92,0
<i>V. inusitatus</i> LMG 23434 <sup>T</sup>	99,0	91,0	96,0	97,2	93,0
<i>V. rarus</i> LMG 23674 <sup>T</sup>	99,1	84,0	94,0	93,0	86,0
<i>V. superstes</i> DSM 16383 <sup>T</sup>	98,2	ND	99,8	98,4	95,0
<i>V. haliotocoli</i> IAM 14596 <sup>T</sup>	98,3	86,0	95,5	93,8	86,0
<i>V. ezurae</i> DSM 17533 <sup>T</sup>	97,6	86,6	95,7	94,4	86,0
<i>V. neonatus</i> DSM 17531 <sup>T</sup>	97,0	86,1	95,5	93,8	86,0
<i>V. gallicus</i> DSM 16639 <sup>T</sup>	97,5	82,0	92,0	88,5	82,0

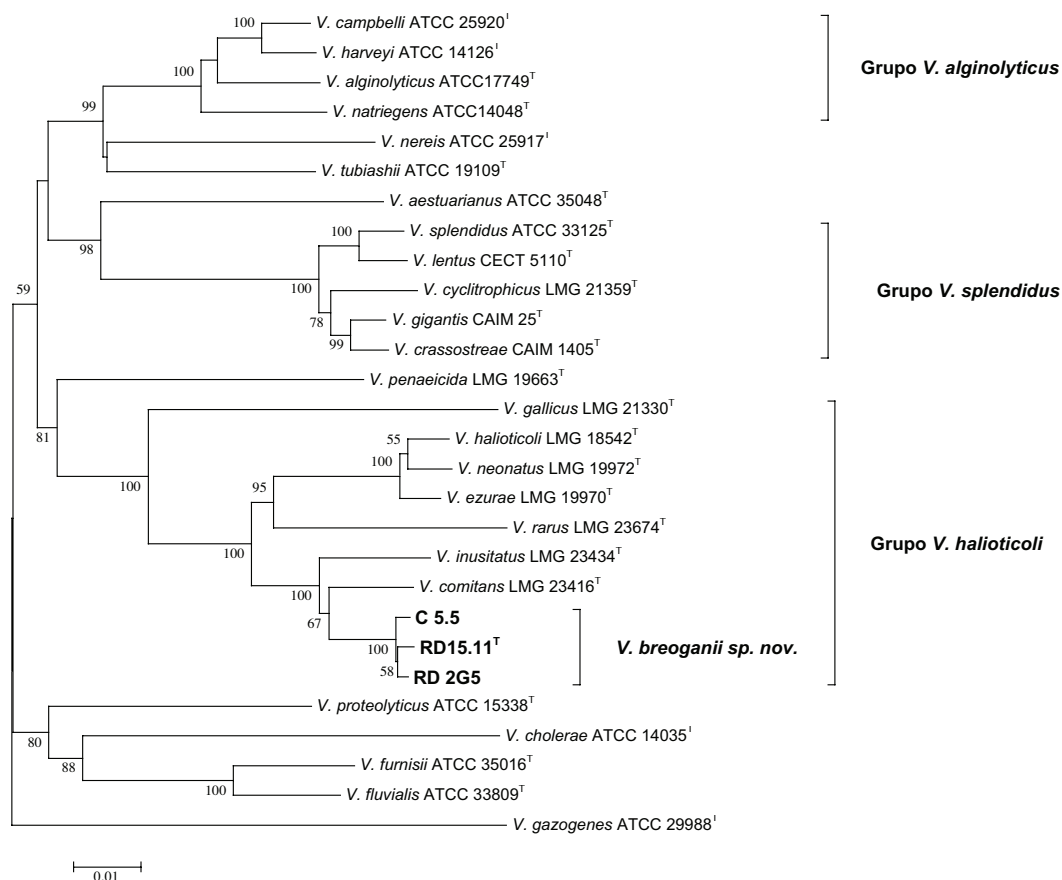
### Selección de un marcador filogenético.

En general, todos los árboles realizados por NJ de los genes 16S rRNA, *rpoA*, *recA*, *atpA* y *pyrH* muestran topologías similares. Todos sitúan la especie *V. gallicus* como la más distante dentro del grupo *V. halioticoli*-like. El gen 16S rRNA sitúa a *V. comitans*, *V. rarus* y *V. inusitatus* como las especies más cercanas a *V. breoganii*; mientras que con los marcadores “housekeeping” son *V. superstes* y *V. comitans*.

Basándonos en estos resultados la elección de un solo marcador filogenético resulta arriesgada. Se descarta el gen *rpoA* ya que no diferencia bien entre *V. superstes* y *V. breoganii*. También se descarta el gen *recA* al no lograr obtener una amplificación en la especie *V. superstes*. El gen *pyrH* demuestra ser útil para discriminar *V. breoganii* ya que tiene bajos porcentajes de similitud con especies cercanas, pero presenta el inconveniente de la ausencia de secuencias de *Vibrio* depositadas en el GenBank. Finalmente, el gen *atpA* también muestra un alto poder discriminativo aunque con porcentajes de similitud con especies cercanas más altos. Este hecho junto con la disponibilidad de acceso a las secuencias, lo hace el más indicado como marcador filogenético. De cualquier manera, el uso conjunto de los 4 marcadores “housekeeping” refuerza la posición taxonómica obtenida por el gen 16S rRNA de *V. breoganii* con respecto a otras especies cercanas.

### Genes concatenados.

Para observar la posición taxonómica de *V. breoganii* desde el punto de vista global con respecto a otros 25 vibrios se realizó un árbol filogenético a partir del concatenado del gen 16S rRNA y los tres genes “housekeeping” *rpoA*, *recA* y *atpA* (Figura 5.10). Se observa claramente la diferenciación de los distintos clados de *Vibrio*, formando nuestros aislados un grupo separado dentro del clado de *V. halioticoli*.



**Figura. 5.10.** Árbol filogenético construido con secuencias concatenadas de los genes 16S rRNA, *rpoA*, *recA* y *atpA* de 3 cepas de *V. breoganii*, y 25 cepas tipo del género *Vibrio*. Características igual que en la Figura 5.5.

#### 5.3.1.5. Determinación del porcentaje G+C e hibridación DNA-DNA.

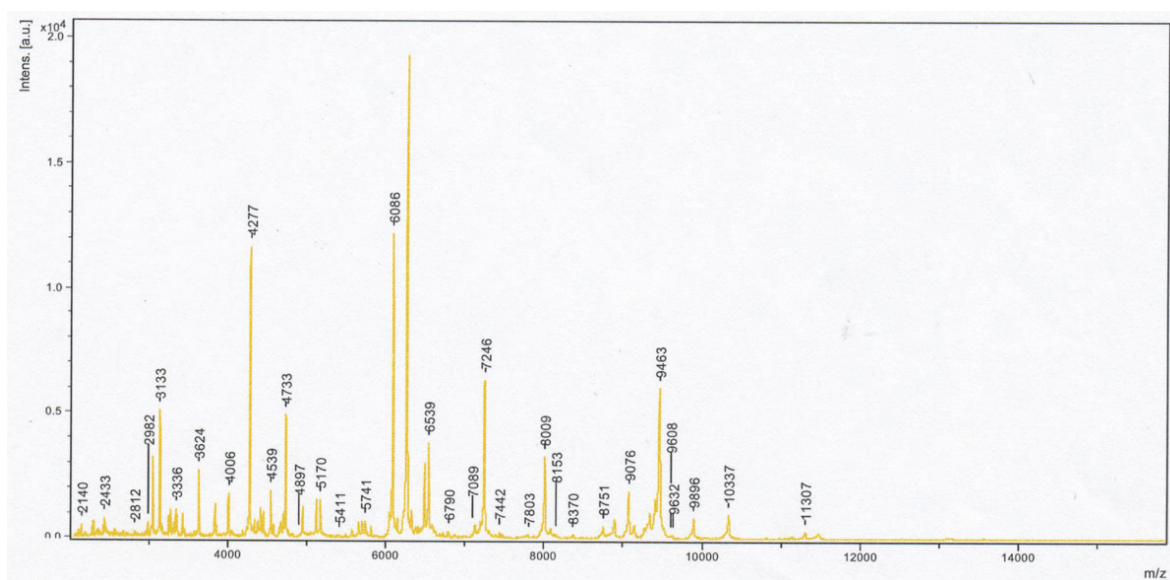
El porcentaje G+C está dentro del rango 38.8-50.6% descrito para especies del género *Vibrio* (Urbanczyk y col. 2007), correspondiendo a la cepa RD 15.11<sup>T</sup> el valor de 44,4%.

Los porcentajes de hibridación de la cepa tipo RD 15.11<sup>T</sup> con sus congéneres más cercanos fueron en orden decreciente: 58% con *V. superstes* LMG 21323<sup>T</sup>, 36% con *V. comitans* LMG 23416<sup>T</sup>, 28% con *V. inusitatus* LMG 23434<sup>T</sup>, 18% con *V. neonatus* LMG 19973<sup>T</sup>, 15% con *V. rarus* LMG 23674<sup>T</sup> y 14% con *V. haliotocoli* LMG 18542<sup>T</sup>.

Este estudio polifásico presenta evidencias claras para apoyar que las siete cepas estudiadas se consideren una nueva especie dentro del género *Vibrio*, para la que se propone el nombre *Vibrio breoganii* sp. nov., con la cepa tipo RD 15.11<sup>T</sup> (=CECT 7222<sup>T</sup> = LMG 23858<sup>T</sup>) aislada de almeja (*Ruditapes decussatus*).

### 5.3.1.6. MALDI-TOF-MS.

El perfil de proteínas obtenido mediante la técnica MALDI-TOF-MS para la cepa tipo de *V. breoganii* se muestra en la Figura 5.11. El espectro de proteínas en la región de masa/carga ( $m/z$ ) comprende valores entre 3000 y 12000. Los  $m/z$  de las proteínas mayoritarias fueron de 3133, 4277, 4733, 6086, 6312, 6539, 7246, 8009 y 9463. El perfil obtenido fue específico y se realizó una correlación con los perfiles de la base de datos. Se obtuvo un valor logarítmico de 2,797 de la cepa RD 15.11<sup>T</sup> con ella misma como control positivo. La especie con el perfil proteico más similar fue *V. superstes* (DSM 16383<sup>T</sup>) con una puntuación de 2,060; en el resto de las especies se obtuvieron valores  $< 1,850$ .

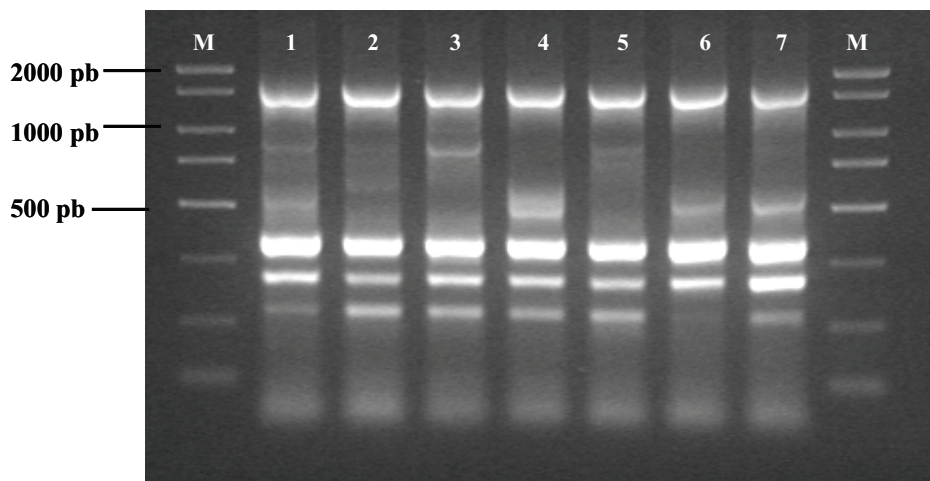


**Figura 5.11.** Perfil de proteínas de la cepa tipo de *V. breoganii* RD 15.11<sup>T</sup> obtenido mediante la técnica MALDI-TOF-MS.

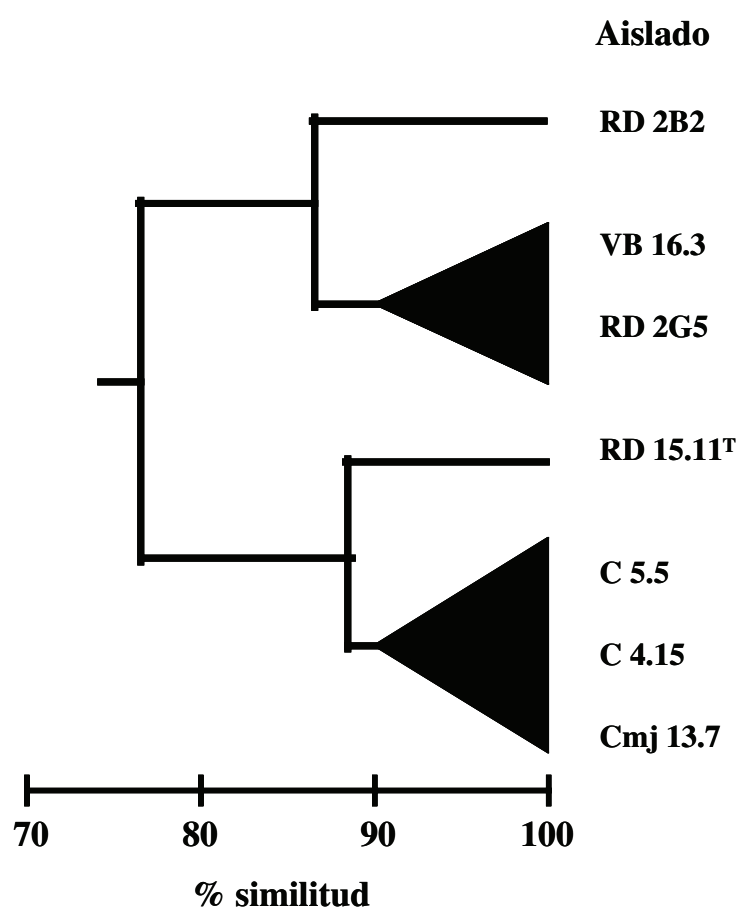


*5.3.1.7. Análisis por ERIC y REP-PCR de V. breoganii sp. nov.*

Mediante la técnica de REP-PCR se obtuvieron 5-6 bandas entre 150 y 2000 pb, dependiendo del aislado. Se obtuvieron 4 perfiles genéticos con altos porcentajes de homología: 2 “clusters” con 2 y 3 cepas con porcentajes de similitud superiores al 90% y 2 perfiles específicos para la cepa tipo RD 15.11<sup>T</sup> y para la cepa RD 2B2 con homologías superiores al 80% con respecto al resto de los aislados (Figuras 5.12 y 5.13).

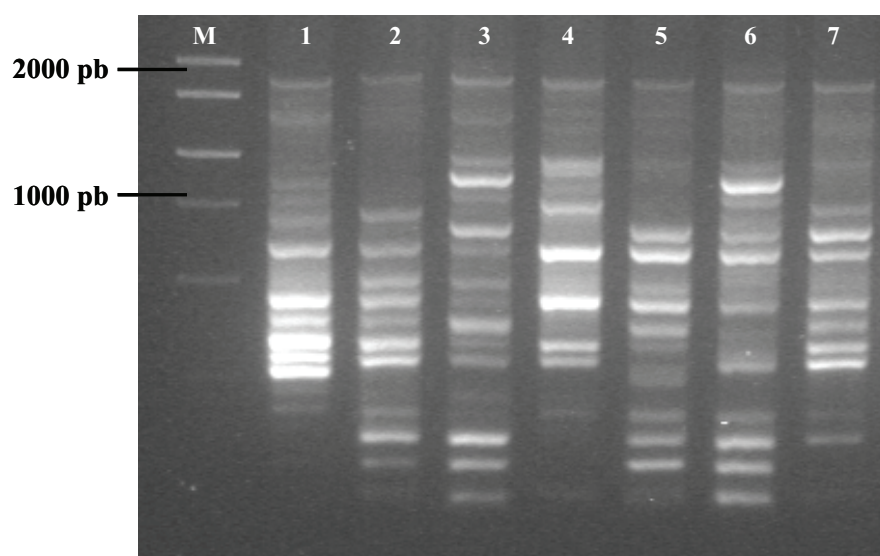


**Figura 5.12.** Patrones de REP-PCR de 7 aislados de *V. breoganii* sp. nov. M, marcador de peso molecular (50-2000 pb; Sigma); **1**, RD 15.11<sup>T</sup>; **2**, VB 16.3; **3**, RD 2G5; **4**, C 5.5; **5**, RD 2B2; **6**, C 4.15; **7**, CMJ 13.7.

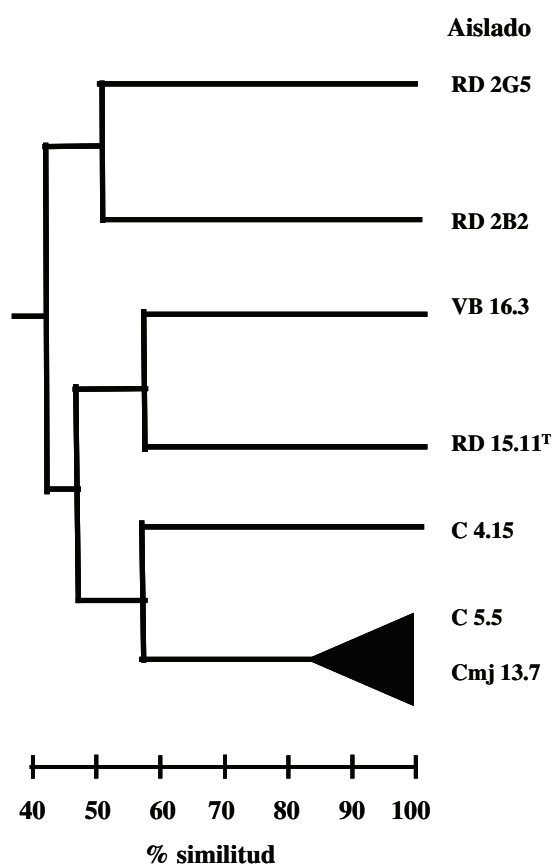


**Figura 5.13.** Dendrograma de similitud entre perfiles de REP-PCR de *V. breoganii* sp. nov., obtenido mediante el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA.

La técnica de ERIC-PCR permitió obtener de 11 a 15 bandas entre 150 y 2000 pb. Los resultados no confirmaron los obtenidos mediante REP-PCR. Se obtuvieron un total de 6 perfiles genéticos. Se formó un “cluster” de 2 cepas con porcentajes de similitud superiores al 82%. El resto de los perfiles fueron específicos para cada cepa presentando porcentajes de homología menores que el 60% (Figuras 5.14 y 5.15).



**Figura 5.14.** Patrones de ERIC-PCR de 7 aislados de *V. breoganii* sp. nov. M, marcador de peso molecular (50-2000 pb; Sigma); **1**, RD 15.11<sup>T</sup>; **2**, VB 16.3; **3**, RD 2G5; **4**, C 5.5; **5**, RD 2B2; **6**, C 4.15; **7**, CMJ 13.7.



**Figura 5.15.** Dendrograma de similitud entre perfiles de ERIC-PCR de *V. breoganii* sp. nov., obtenido mediante el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA.

5.3.1.8. Descripción de *Vibrio breoganii* sp. nov.

*Vibrio breoganii* [bre.o.gan' i.i, M. L. masc. gen. n. breoganii de Breogán, mítico rey Celta de Galicia].

Son bacterias Gram negativas, halófilas, anaerobias facultativas, inmóviles y bacilos cortos sin flagelo. Sus dimensiones son 0,5-0,7 x 1,0-1,5  $\mu\text{m}$ . Cuando se incuban en AM a  $24 \pm 1$  °C durante 24 h forman colonias redondeadas y translúcidas de color crema y con un diámetro entre 0,3 y 0,7 mm. No se observa “swarming” ni son luminiscentes. En TCBS las colonias son de color verde opaco, excepto la cepa RD2G5 que forma colonias de aspecto amarillo traslúcido. No hay crecimiento a temperaturas de 37°C o superiores. Todas las cepas son sensibles al agente vibriostático O/129 (150  $\mu\text{g}$  por disco) y resistentes a la ampicilina (10  $\mu\text{g}$  por disco) excepto la cepa C5.5. Todas son arginina dihidrolasa, lisina y ornitina decarboxilasa negativas, fermentan la glucosa sin producción de gas y son positivas para las pruebas de la oxidasa y catalasa. Reducen los nitratos a nitritos. Las pruebas del indol, VP, H<sub>2</sub>S, gelatinasa, amilasa, citrato, lipasa y DNasa son negativas. Las pruebas rojo metilo, ONPG y alginasa son positivas. Todas las cepas fermentan las siguientes fuentes de carbono: D-xilosa, D-galactosa, D-fructosa, D-manitol, N-acetil-glucosamina, amigdalina, esculina, salicina, D-celobiosa, D-maltosa, gentiobiosa, gluconato potásico y 2-cetogluconato potásico. Ninguna cepa fermenta el glicerol, eritritol, D-arabinosa, L-arabinosa, D-adonitol, metil- $\alpha$ -D-xilopiranosida, L-sorbosa, L-ramnosa, dulcitol, inositol, D-sorbitol, metil- $\alpha$ -D-manopiranosida, metil- $\alpha$ -D-glucopiranosida, D-trealosa, inulina, D-melezitosa, D-rafinosa, xilitol, D-turanosa, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, D-arabitol, L-arabitol y 5-cetogluconato potásico.

La cepa tipo (RD 15.11<sup>T</sup>= CECT 7222<sup>T</sup>= LMG 23858<sup>T</sup>), aislada de almeja (*Ruditapes decussatus*), fermenta la D-melibiosa, L-xilosa, arbutina, el glucógeno y la D-lactosa pero no la sacarosa, D-ribosa, D-manosa o la L-ramnosa.

### **5.3.2. *Vibrio gallaecicus* sp. nov.**

#### *5.3.2.1. Caracterización fenotípica.*

##### Metodología clásica.

Los tres aislados marinos VB 8.9<sup>T</sup>, VB 5.12 y C 8.10 forman el cluster de AFLP 48. Comparten las características fenotípicas del género *Vibrio*. Son móviles, anaerobias facultativas, Gram negativas y oxidasa positivas, sensibles al agente vibriostático O/129 (150 µg/disco), resistentes a la ampicilina (10 µg/disco) y reducen los nitratos a nitritos. Crecen en TCBS, la cepa VB 5.12 es la única cepa sacarosa positiva. Son negativas para las pruebas arginina dihidrolasa, lisina y ornitina decarboxilasa, urea, VP, citrato y alginasa. Son positivas para las pruebas del indol, gelatinasa, amilasa, lipasa y DNasa. No producen gas pero sí acidifican la glucosa. Crecen a 4°C pero no a 37°C, ni a salinidades igual o superiores que al 6% de NaCl.

##### Sistemas miniaturizados.

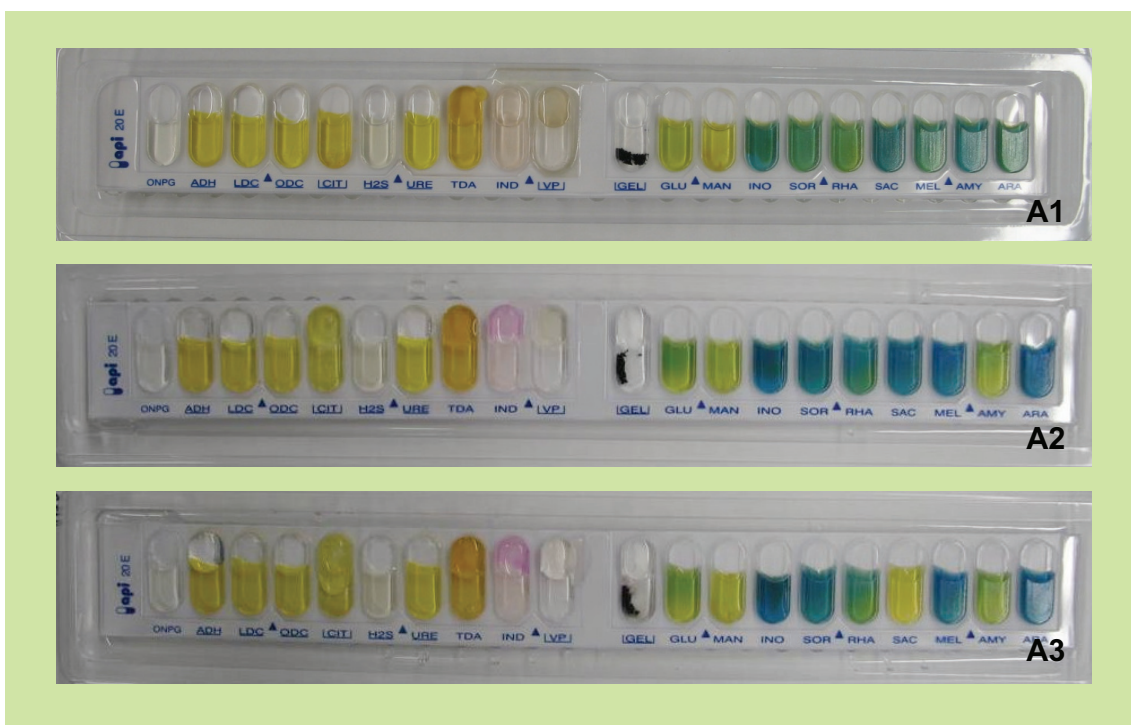
En la Figura 5.16A se muestran los resultados para las tres cepas de *V. gallaecicus* para la galería API 20E. Los perfiles de las 3 cepas obtenidos con el sistema API 20E no fueron homogéneos. Las reacciones positivas para la cepa tipo (VB 8.9<sup>T</sup>) fueron la producción de ácido de glucosa, manitol y fermentación de la ramnosa. Las cepas C 8.10 y VB 5.12 además fueron positivas en las pruebas del indol y amigdalina y para la cepa VB 5.12 se obtuvo un resultado positivo en la utilización de la sacarosa. Al comparar los resultados obtenidos con este sistema miniaturizado y los de las pruebas clásicas, se reveló la existencia de resultados falsos negativos para las pruebas del indol (sólo en la cepa tipo) y gelatinasa.

En el caso del sistema API ZYM los resultados fueron totalmente homogéneos (Figura 5.16B). Las actividades enzimáticas positivas fueron la fosfatasa alcalina, esterasa, esterasa lipasa y leucina arilamidasa.

Según los resultados obtenidos con la galería API 50CH incubada en anaerobiosis, los tres aislados fermentan las siguientes fuentes de carbono: glicerol, D-ribosa, D-glucosa, D-

frutosa, D-manosa, D-manitol, N-acetil-glucosamina, esculina, D-celobiosa, D-maltosa, D-trealosa, almidón, glicógeno, gluconato potásico y 2-cetogluconato potásico (Figura 5.17). Las pruebas variables, positivas sólo para la cepa VB5.12, son la amigdalina, D-sacarosa y gentiobiosa. El resto de los resultados se detallan en la Tabla 5.7.

(A)



(B)



**Figura 5.16.** Resultados de los sistemas miniaturizados de cepas de *V. gallaecicus*: **(A)** API 20E de las cepas VB 8.9<sup>T</sup> (A1), C 8.10 (A2) y VB 5.12 (A3); **(B)** API ZYM de la cepa VB 8.9<sup>T</sup>.





**Figura 5.17.** Resultados del sistema miniaturizado API 50CH de la cepa tipo de *V. gallaecicus*, VB 8.9<sup>T</sup>.

**Tabla 5.7.** Resultados de fermentación de diferentes fuentes de carbono por las 3 cepas *V. gallaecicus* sp. nov. obtenidos con el sistema miniaturizado API 50CH.

Fuente de carbono		VB 8.9 <sup>T</sup>	C 8.10	VB 5.12
GLY	glicerol	+	+	+
ERY	eritritol	-	-	-
DARA	D-arabinosa	-	-	-
LARA	L-arabinosa	-	-	-
RIB	D-ribosa	+	+	+
DXYL	D-xilosa	-	-	-
LXYL	L-xilosa	-	-	-
ADO	D-adonitol	-	-	-
MDX	Meti-β-D-xilopiranosida	-	-	-
GAL	D-galactosa	-	-	-
GLU	D-glucosa	+	+	+
FRU	D-fructosa	+	+	+
MNE	D-manosa	+	+	+
SBE	L-sorbosa	-	-	-
RHA	L-ramnosa	-	-	-
DUL	dulcitol	-	-	-
INO	inositol	-	-	-
MAN	D-manitol	+	+	+
SOR	D-sorbitol	-	-	-
MDM	methil-α-D-manopiranosida	-	-	-
NDG	metil-α-D-glucopiranosida	-	-	-
NAG	N-acetil-glucosamina	+	+	+
AMY	amigdalina	-	-	+
ARB	arbutina	-	-	-
ESC	esculina	+	+	+
SAL	salicina	-	-	-
CEL	D-celobiosa	+	+	+
MAL	D-maltosa	+	+	+
LAC	D-lactosa	-	-	-
MEL	D-melibiosa	-	-	-
SAC	D-sacarosa	-	-	+
TRE	D-trealosa	+	+	+
INU	inulina	-	-	-
MLZ	D-melezitosa	-	-	-
RAF	D-rafinosa	-	-	-
AMD	almidón	+	+	+
GLYG	glucógeno	+	+	+
XLT	xilitol	-	-	-
GEN	gentiobiosa	+	+	+
TUR	D-turanosa	-	-	-
LYX	D-lixosa	-	-	-
TAG	D-tagatosa	-	-	-
DFUC	D-fucosa	-	-	-
LFUC	L-fucosa	-	-	-
DARL	D-arabitol	-	-	-
LARL	L-arabitol	-	-	-
GNT	gluconato potásico	+	+	+
2KG	2-cetogluconato potásico	+	+	+
5KG	5-cetogluconato potásico	-	-	-

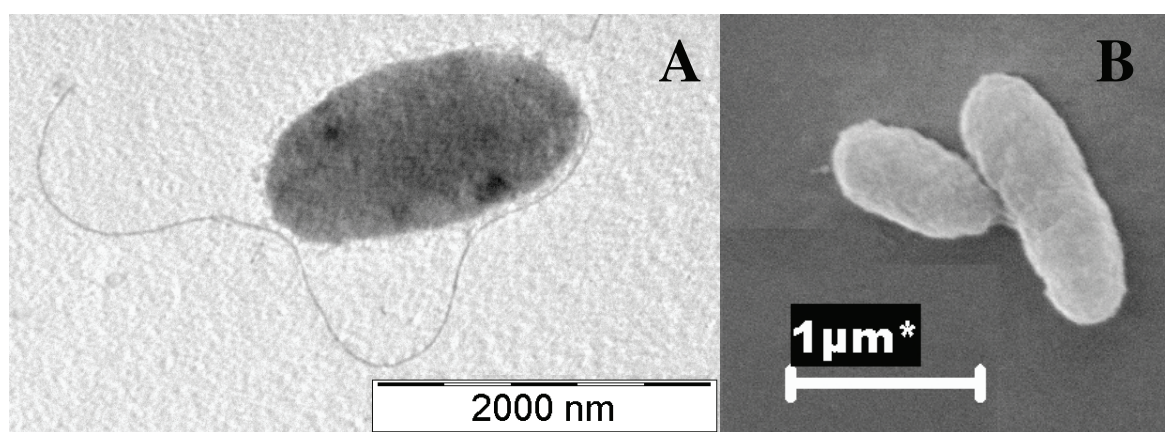


*5.3.2.2. Diferenciación fenotípica de especies cercanas.*

Se han encontrado algunas pruebas fenotípicas útiles para diferenciar *V. gallaecicus* de otras especies de *Vibrio* cercanas, tal y como se muestra en la Tabla 5.8. Se obtuvieron claras diferencias mediante el API ZYM en las pruebas: tripsina y fosfatasa ácida, negativas sólo para *V. gallaecicus* en comparación con otras cepas tipo del grupo de *V. splendidus*, y naftol-AS-BI-fosfohidrolasa (Tabla 5.8).

*5.3.2.3. Microscopía electrónica.*

Mediante la microscopía electrónica se pudo observar que las células de *V. gallaecicus* son bacilos grandes con presencia de un flagelo polar. El tamaño es variable, en un rango de 0,76-0,91  $\mu\text{m}$  de ancho por 1,45-1,82  $\mu\text{m}$  de largo. Se observó la presencia del flagelo y cápsula mediante la microscopía electrónica de transmisión. Los flagelos no se pudieron observar en la microscopía de barrido debido probablemente a su destrucción durante el procesado de las muestras (Figura 5.18).



**Figura 5.18.** (A) Fotografía electrónica de transmisión de la cepa tipo de *V. gallaecicus* VB 8.9<sup>T</sup>. (B) Fotografía electrónica de barrido de la cepa tipo de *V. gallaecicus* VB 8.9<sup>T</sup>.

**Tabla 5.8.** Características fenotípicas para diferenciar la nueva especie *Vibrio gallaecicus* de especies de *Vibrio* cercanas desde el punto de vista fenotípico.

Prueba	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ADH	-	+	-	+	V+	-	-	V+	+	-
ONPG*	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
Voges Proskauer	-	-	-	-	-	+	V+	-	-	ND
Ácido a partir de:										
D-sacarosa*	V-(1)	-	-	+	+	-	-	+	-	+
D-manitol*	+	+	+	+	+	+	V-	ND	ND	+
D-melibiosa*	-	-	V	+	V-	-	V-	-	-	-
Amigdalina*	V-(2)	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L-arabinosa*	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Sensibilidad a:										
O/129 (150µg)	+	+	+	+	+	+	-	V	+	+
Ampicilina*	-	-	-	+	-	+	+	V	-	+
Crecimiento a:										
35°C	-	-	V	-	-	+	-	-	-	+
6% NaCl	-	V-	-	V+	+	V	+	+	+	+
8% NaCl	-	-	V	-	+	-	-	V	V	+
Hidrólisis de:										
Gelatina	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Alginato*	-	V+	-	-	+	-	V-	-	-	+
Tween 80*	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
API ZYM										
Tripsina*	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fosfatasa ácida*	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa*	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-

+, positivo; -, negativo; V +, variable pero la cepa tipo es positiva (número de cepas positivas); V -, variable pero la cepa tipo es negativa (número de cepas positivas); \* realizado en el laboratorio con la cepa tipo; ND, dato no disponible. Especies (nº de cepas): 1, *V. gallaecicus* (3); 2, *V. gigantis* DSM 18531<sup>T</sup>; 3, *V. splendidus* I, ATCC 33125<sup>T</sup>; 4, *V. crassostreae*, LMG 22240<sup>T</sup>; 5, *V. pomeroyi*, LMG 20537<sup>T</sup>; 6, *V. tasmaniensis*, LMG 21574<sup>T</sup>; 7, *V. lentus* CECT 5110<sup>T</sup>; 8, *V. kanaloae* DSM 17181<sup>T</sup>; 9, *V. chagasii* DSM 17138<sup>T</sup>; 10, *V. cyclitrophicus*, LMG 21359<sup>T</sup>. Todas las especies son negativas para las pruebas: lisina y ornitina decarboxilasa, producción de ácido de inositol, D-sorbitol y L-ramnosa. Todas son positivas en la prueba del indol e hidrólisis de almidón. Datos de Hedlund y Staley (2001), Faury y col. (2004), Le Roux y col. (2005), Macián y col. (2001), Thompson y col. (2003a, b)

5.3.2.4. *Análisis filogenético.*

16S rRNA.

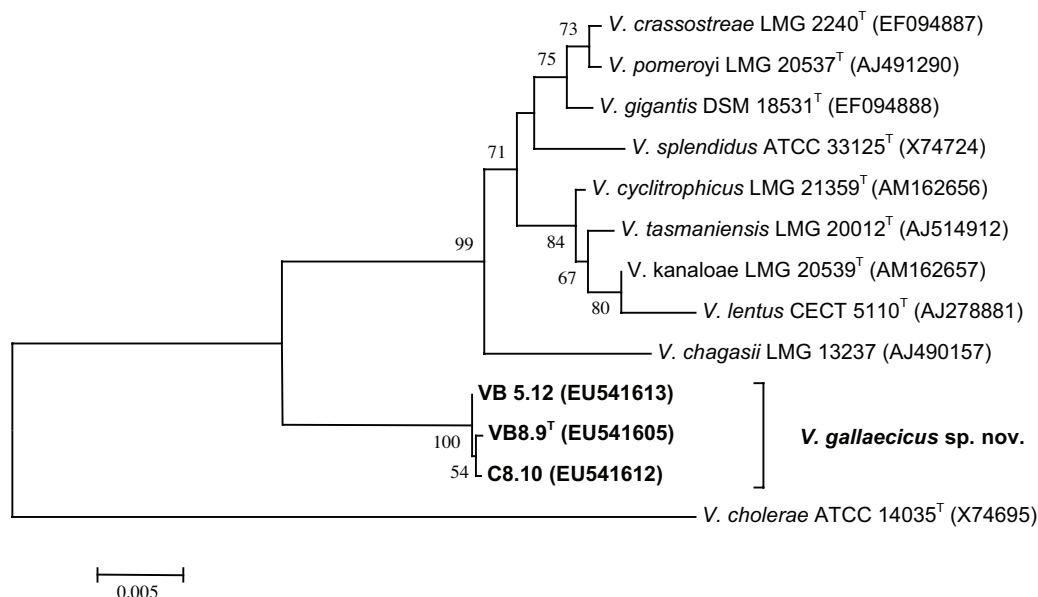
Los resultados del análisis filogenético basado en el gen 16S rRNA demuestran claramente que las 3 cepas de *V. gallaecicus* pertenecen al subgrupo 3 de las  $\gamma$  *Proteobacterias*. Los congéneres filogenéticos más cercanos de los tres aislados de almeja pertenecen al clado de *V. splendidus* (Figura 5.15), pero ninguna especie aparece próxima a *V. gallaecicus*. Las tres cepas poseen un valor de similitud en el gen 16S rRNA entre ellas mayor que 99,9%. Los valores de similitud con otras especies oscilan entre 97,6% (VB 8.9<sup>T</sup> y *V. splendidus* ATCC 33125<sup>T</sup>) y 96,0% (VB 8.9<sup>T</sup> y *V. chagasii* LMG 13237), en todo caso menores que el valor de variabilidad intraespecífica (98,7%) propuesto por Stackebrandt y Ebberts (2006), lo que permite discriminar nuestros aislados a nivel de especie. Las secuencias del gen 16S rRNA de los aislados están depositadas en el GenBank, correspondiéndoles los códigos que se citan en el árbol filogenético (Figura 5.19).

Genes “housekeeping”.

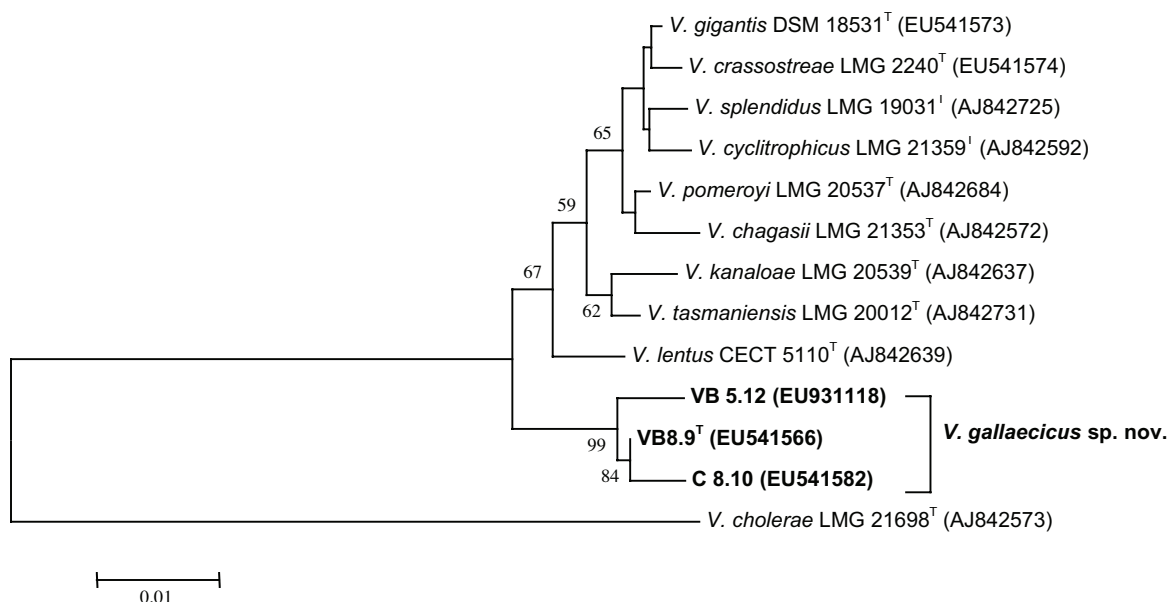
Para reforzar la filogenia de la nueva especie, al igual que en el caso anterior se secuenciaron los mismos genes “housekeeping”. La Tabla 5.9 muestra todos los porcentajes de similitud de *V. gallaecicus* con vibrios cercanos para el gen 16S rRNA y los cuatro genes “housekeeping”.

***rpoA***

El valor de similitud entre los aislados de *V. gallaecicus* secuenciados (VB 8.9<sup>T</sup> y C 8.10) para este gen es de 99,6%. Las similitudes con respecto a los otros vibrios cercanos oscilan entre 98,2% con *V. lentus* (LMG 21034<sup>T</sup>) y 97,0% con *V. gigantis* (DSM 18531<sup>T</sup>) y *V. crassostreae* (LMG 22240<sup>T</sup>). El árbol filogenético muestra una rama separada con valores de “bootstrap” del 100% para los aislados secuenciados (Figura 5.20).



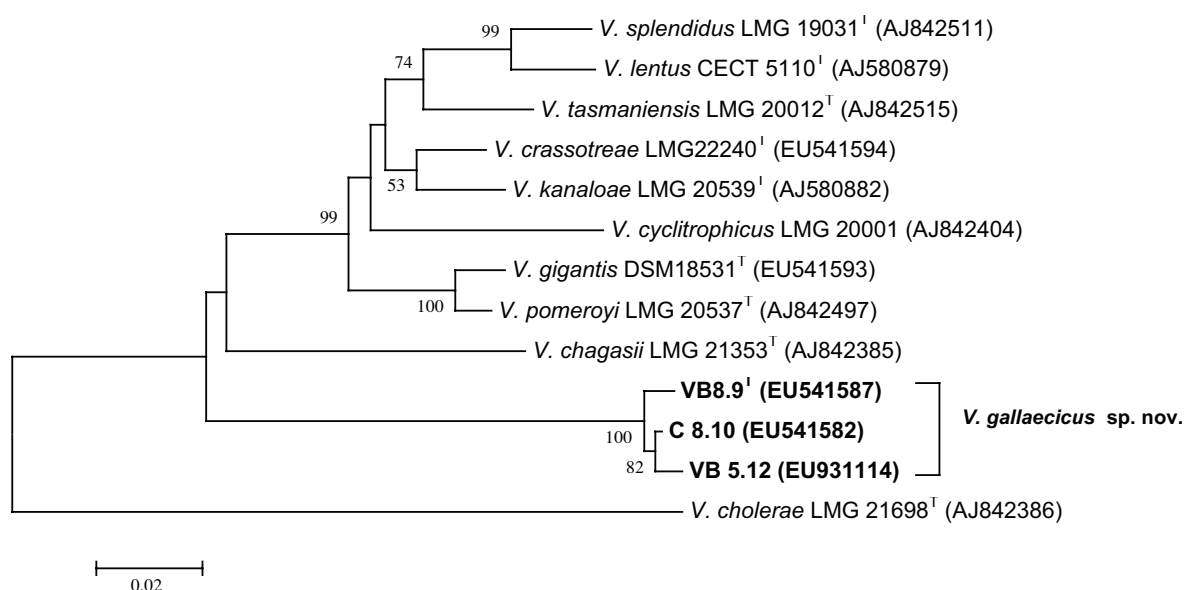
**Figura. 5.19.** Árbol filogenético construido con secuencias del gen 16S rRNA de 3 cepas de *V. gallaecicus*, y de especies más próximas. Se utiliza como “outgroup” *Vibrio cholerae*. La longitud de las ramas horizontales es proporcional a la divergencia evolutiva. Los valores de “bootstrap” (>50%) de 1000 réplicas aparecen próximos a la rama correspondiente.



**Figura. 5.20.** Árbol filogenético construido con secuencias del gen *rpoA* de cepas de *V. gallaecicus*, y de especies más próximas. Características igual que en la Figura 5.19.

### *recA*

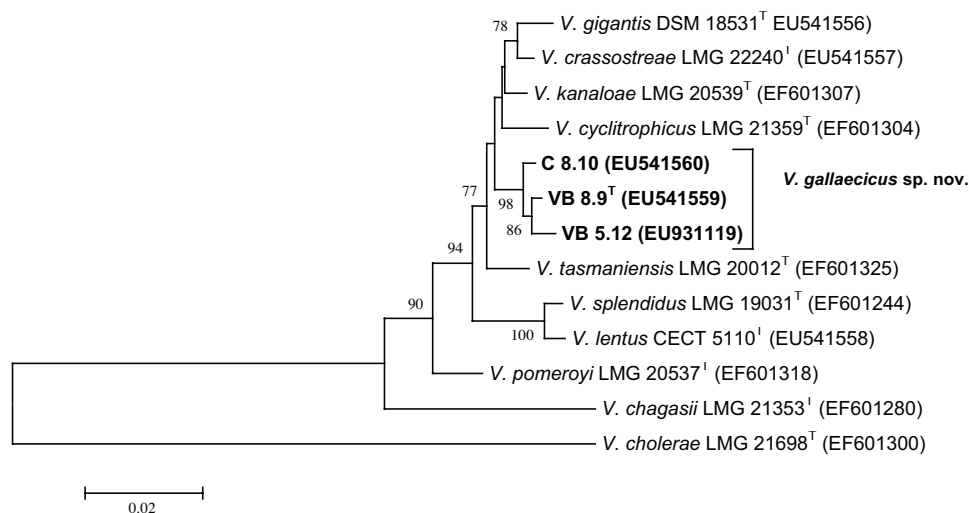
En este caso la similitud entre cepas de *V. gallaecicus* es de un 99,2%. El mayor valor de similitud (87,6%) se obtiene con *V. chagasii* (LMG 21353<sup>T</sup>) y el menor (86,0%) con *V. gigantis* (DSM 18531<sup>T</sup>) y *V. pomeroyi* (LMG 20537<sup>T</sup>). También se observa una rama independiente, con valores de “bootstrap” de 100%, agrupando los aislados de *V. gallaecicus* (Figura 5.21).



**Figura. 5.21.** Árbol filogenético construido con secuencias del gen *recA* de cepas de *V. gallaecicus*, y de especies más próximas. Características igual que en la Figura 5.19.

### *atpA*

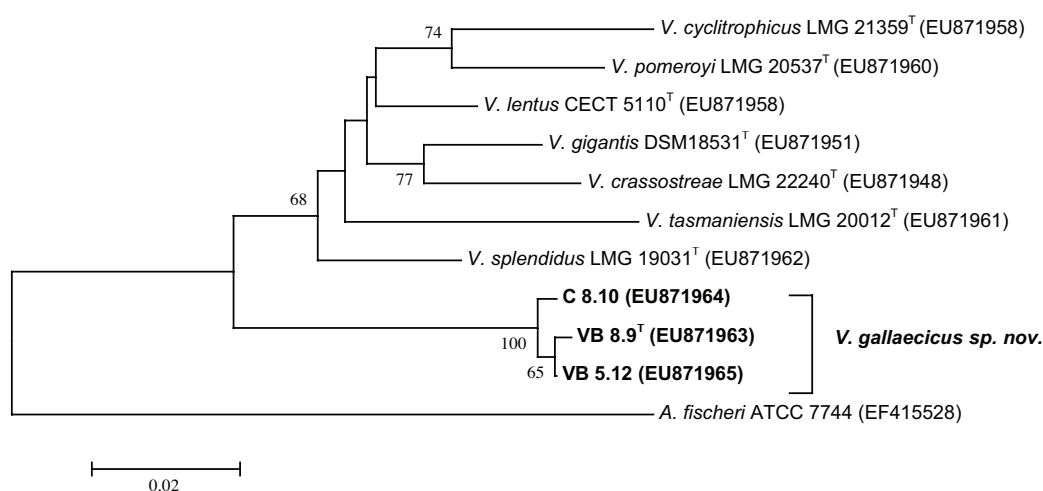
El árbol filogenético del gen *atpA* también confirma el agrupamiento de las cepas de *V. gallaecicus*, diferenciándolas del resto de las especies de *Vibrio* (Figura 5.22). En este caso aparecen en una bifurcación cerca de *V. tasmaniensis*. El porcentaje de similitud entre los aislados de *V. gallaecicus* es de 99,5%. Los valores de similitud con vibrios cercanos oscilan entre 98,9% con *V. kanaloae* (LMG 20539<sup>T</sup>) y 93,6% con *V. chagasii* (LMG 21353<sup>T</sup>).



**Figura. 5.22.** Árbol filogenético construido con secuencias del gen *atpA* de cepas de *V. gallaecicus*, y de especies más próximas. Características igual que en la Figura 5.19.

### *pyrH*

El árbol filogenético del gen *pyrH* agrupa de nuevo las cepas de *V. gallaecicus* en una rama independiente con valores de “bootstrap” del 100%, diferenciándolas claramente del resto de las especies cercanas (Figura 5.23), que fue necesario secuenciar al no estar depositadas en el GenBank, tal y como sucedió en el caso anterior. El porcentaje de similitud más alto es de 93% con *V. lentus* (CECT 5110<sup>T</sup>) y el menor de 90% con *V. tasmaniensis* (LMG 21574<sup>T</sup>).



**Figura. 5.23.** Árbol filogenético construido con secuencias del gen *pyrH* de cepas de *V. gallaecicus*, y de especies más próximas. Se utiliza como “outgroup” *Aliivibrio fischeri*. Características igual que en la Figura 5.19.

**Tabla 5.9.** Resultados de similitud (%) de las secuencias de los genes 16S rRNA, *recA*, *rpoA*, *atpA* y *pyrH* de la cepa VB 8.9<sup>T</sup> y especies de *Vibrio* cercanas.

Cepas tipo	VB 8.9 <sup>T</sup>				
	16S	<i>recA</i>	<i>rpoA</i>	<i>atpA</i>	<i>pyrH</i>
<i>V. splendidus</i> ATCC 33125 <sup>T</sup>	97,6	86,5	97,8	97,2	92,0
<i>V. gigantis</i> DSM 18531 <sup>T</sup>	97,3	86,0	97,0	97,0	91,0
<i>V. pomeroi</i> LMG 20537 <sup>T</sup>	97,1	86,0	97,8	97,3	91,0
<i>V. crassostreae</i> LMG 22240 <sup>T</sup>	97,1	86,0	97,0	97,0	91,0
<i>V. lentus</i> CECT 5110 <sup>T</sup>	96,7	86,6	98,2	97,0	93,0
<i>V. tasmaniensis</i> LMG 21574 <sup>T</sup>	96,9	86,7	98,0	98,6	90,0
<i>V. cyclitrophicus</i> LMG 21359 <sup>T</sup>	97,0	86,6	97,7	98,1	91,0
<i>V. chagasii</i> DSM 17138 <sup>T</sup>	96,0	87,6	97,7	93,6	ND
<i>V. kanaloae</i> DSM 17181 <sup>T</sup>	97,0	86,6	97,0	98,9	ND

#### Selección de un marcador filogenético.

Se obtuvieron topologías similares en los árboles de los genes 16S rRNA, *rpoA*, *recA* y *pyrH*, con los aislados de la especie *V. gallaecicus* en una rama filogenética diferente al resto de las especies del grupo *V. splendidus*. Los cuatro genes “housekeeping” confirman la situación filogenética de la nueva especie con respecto a las especies existentes obtenida mediante secuencias del gen 16S rRNA. El gen *atpA* sitúa la especie dentro del clado general, cerca de *V. tasmaniensis*, pero separándola con valores de “bootstrap” de 98%. Todos los genes “housekeeping” separan *V. gallaecicus* del resto de las especies de *Vibrio*, pero se aprecia una posición más distante con los genes *rpoA*, *recA* y *pyrH*. Basándonos en los valores de similitud, el gen *recA* es el más discriminativo. Se puede concluir que el uso conjunto de los 4 marcadores “housekeeping” refuerza la posición taxonómica obtenida por el gen 16S rRNA para *V. gallaecicus* con respecto a otros vibrios cercanos.

### Genes concatenados.

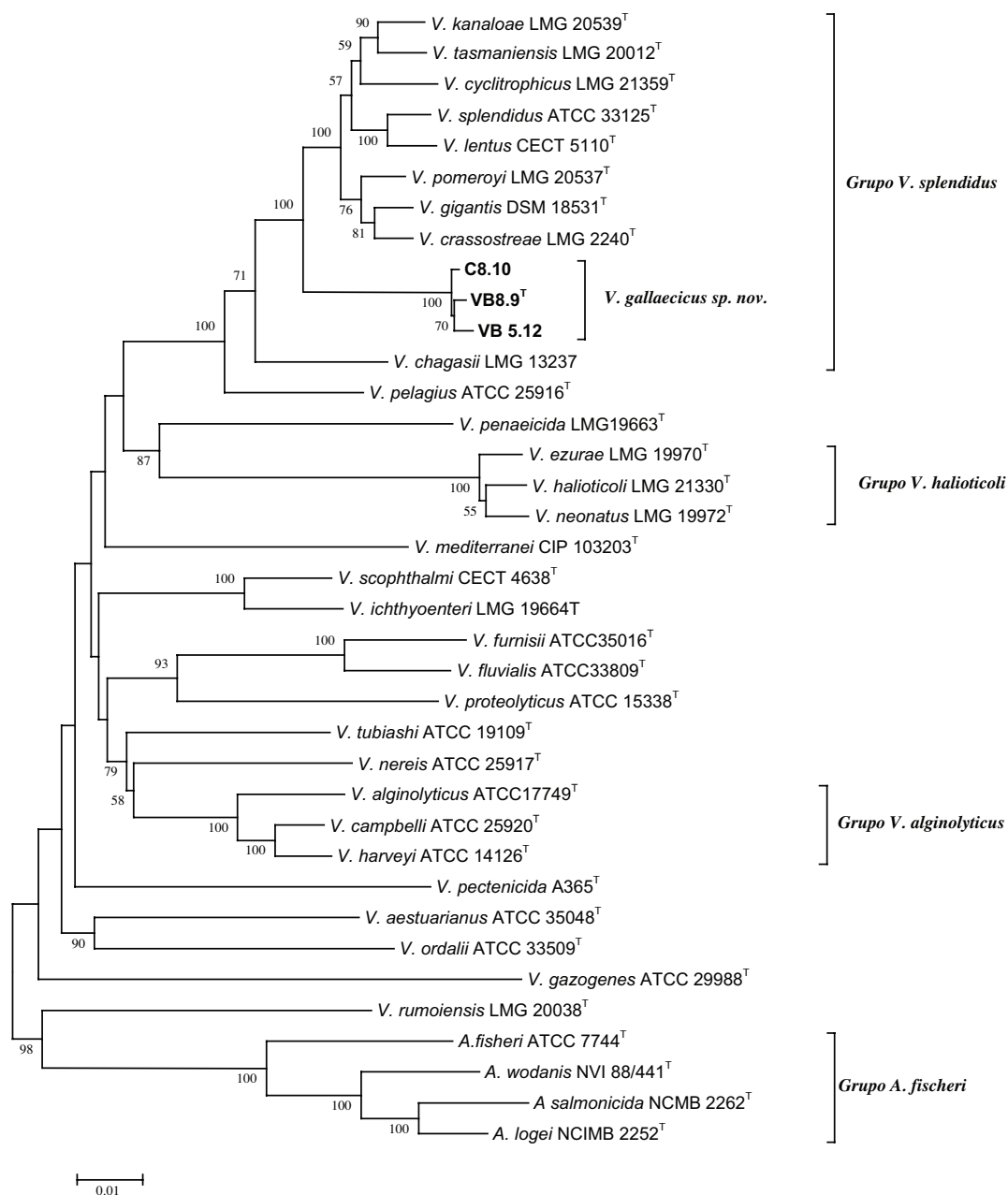
Para observar la posición taxonómica de *V. gallaecicus* con respecto a otros 36 vibrios, se realizó un árbol filogenético a partir del concatenado del gen 16S rRNA y de los genes “housekeeping” *rpoA* y *recA* (Figura 5.24). Se observa claramente la diferenciación de los distintos clados de *Vibrio*, formando nuestros aislados un grupo separado dentro del clado de especies *V. splendidus*-like.

### 5.3.2.5. MALDI-TOF-MS.

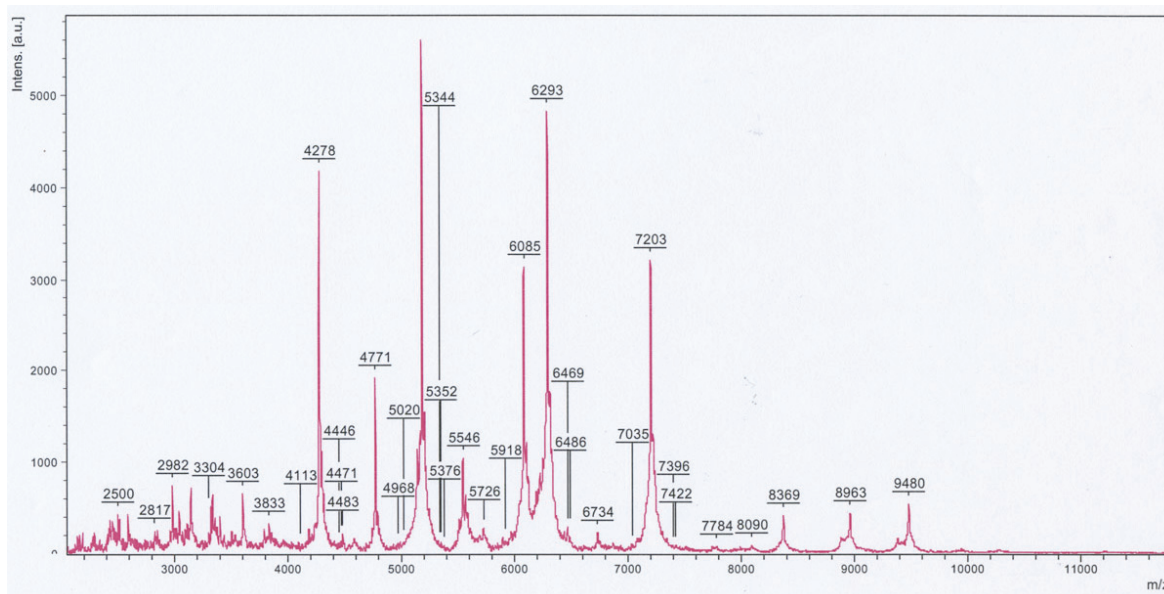
El perfil de proteínas obtenido mediante la técnica MALDI-TOF-MS para la cepa tipo de *V. gallaecicus* se muestra en la Figura 5.25. El espectro de proteínas en la región de masa / carga ( $m/z$ ) comprende valores entre 2000 y 9500. Los  $m/z$  de las proteínas mayoritarias fueron de 4278, 4771, 5186, 6085, 6293 y 7203. El perfil obtenido fue específico y se realizó una correlación con los perfiles de la base de datos. Se obtuvo un valor logarítmico de 2,726 de la cepa VB 8.9<sup>T</sup> con ella misma como control positivo. La especie con el perfil proteico más similar fue *V. gigantis* (LMG 22741<sup>T</sup>) con una puntuación de 1,761; las especies *V. splendidus*-like mostraron los siguientes valores más altos entre 1,525 y 1,731. Las puntuaciones más bajas (<1,479) se obtuvieron con especies que no pertenecen a este grupo que fueron *V. diazotrophicus* y *V. aestuarianus*.

Este estudio polifásico presenta evidencias claras para proponer que las 3 cepas estudiadas se consideren una nueva especie dentro del género *Vibrio*. Se propone el nombre *Vibrio gallaecicus* sp. nov., con la cepa tipo VB 8.9<sup>T</sup> (=CECT 7244<sup>T</sup> = LMG 24045<sup>T</sup>) aislada de almeja (*R. philippinarum*).





**Figura. 5.24.** Árbol filogenético construido con secuencias concatenadas de los genes 16S rRNA, *rpoA* y *recA* de 2 cepas de *V. gallaecicus*, y 36 cepas tipo del género *Vibrio*. Características igual que en la Figura 5.19.

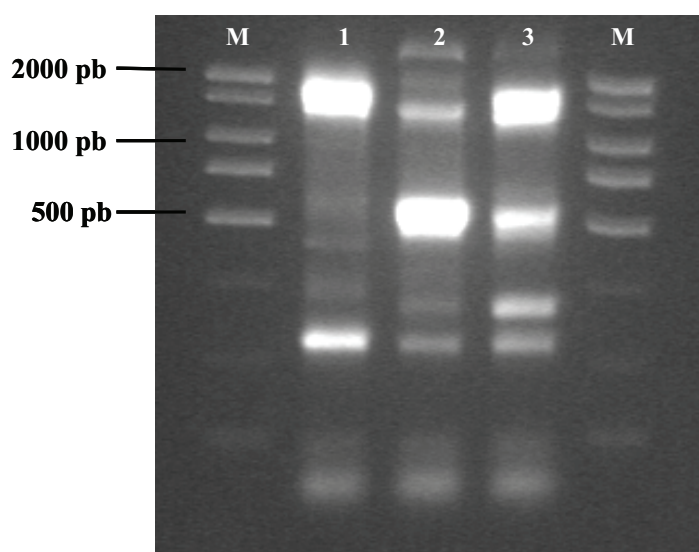


**Figura 5.25.** Perfil de proteínas de la cepa tipo de *V. gallaecicus*, VB 8.9<sup>T</sup> obtenido mediante la técnica MALDI-TOF-MS.

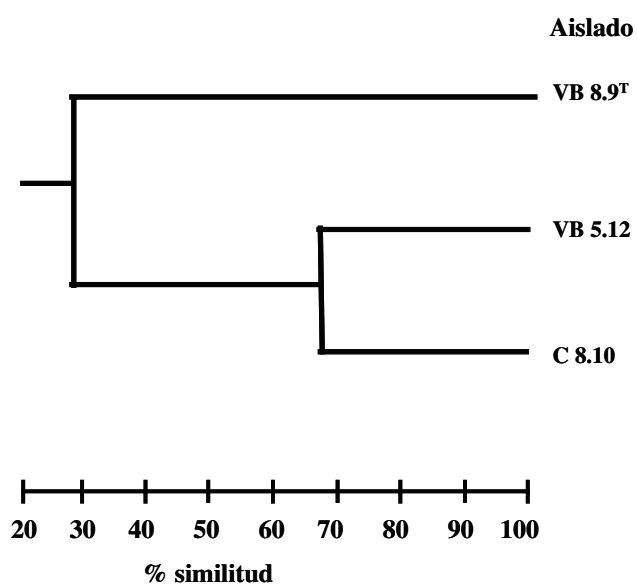
#### 5.3.2.6. Análisis por ERIC y REP-PCR de *V. gallaecicus* sp. nov.

Con la técnica de REP-PCR se obtuvieron 6-7 bandas entre 150 y 2000 pb, dependiendo del aislado. Se obtuvieron perfiles genéticos específicos para cada cepa (Figuras 5.26 y 5.27). La cepa tipo VB 8.9<sup>T</sup> fue la más diferente genéticamente con un porcentaje de similitud del 28% con respecto a las otros dos aislados. Las cepas VB 5.12 y C 8.10 presentaron 68% de homología.

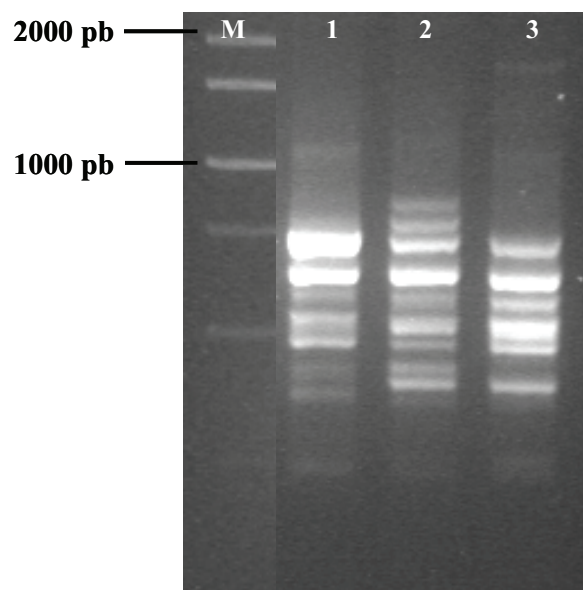
La técnica de ERIC-PCR permitió obtener patrones con mayor número de bandas, de 7 a 10 bandas entre 150 y 2000 pb. Los resultados confirmaron los obtenidos mediante REP-PCR, siendo la cepa tipo la más divergente con el menor porcentaje de homología con respecto a las otras 2 cepas (Figuras 5.28 y 5.29).



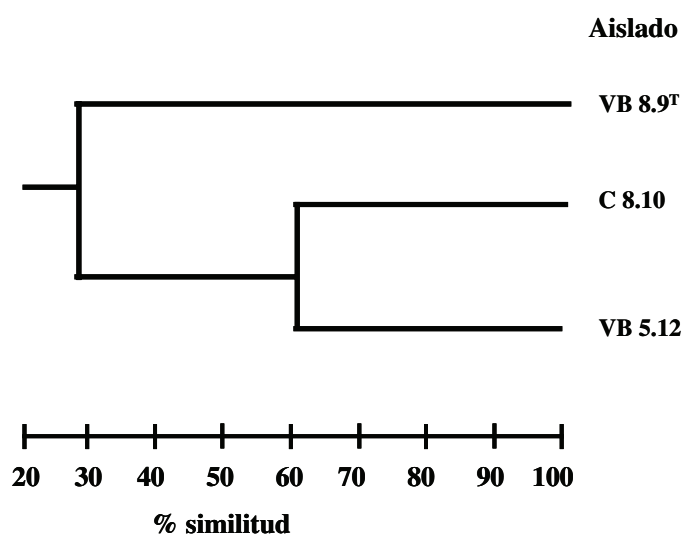
**Figura 5.26.** Patrones de REP-PCR de 3 aislados de *V. gallaecicus* sp. nov. M, marcador de peso molecular (50-2000 pb; Sigma); **1**, VB 8.9<sup>T</sup>; **2**, VB 5.12; **3**, C 8.10.



**Figura 5.27.** Dendrograma de similitud entre perfiles de REP-PCR de *V. gallaecicus* sp. nov., obtenido mediante el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA.



**Figura 5.28.** Patrones de ERIC-PCR de 3 aislados de *V. gallaecicus* sp. nov. M, marcador de peso molecular (50-2000 pb; Sigma); **1**, VB 8.9<sup>T</sup>; **2**, VB 5.12; **3**, C 8.10.



**Figura 5.29.** Dendrograma de similitud entre perfiles de ERIC-PCR de *V. gallaecicus* sp. nov., obtenido mediante el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA.

5.3.2.7. Descripción de *Vibrio gallaecicus* sp. nov.

*Vibrio gallaecicus* [gal'.lae.ci.cus. L. masc. adj. gallaecicus de Galicia].

Las cepas son Gram negativas, anaerobias facultativas, bacilos cortos móviles y de dimensiones 0,7-0,9 x 1,4-1,8  $\mu\text{m}$ . Las colonias son redondeadas de color crema sin “swarming” en placas de AM. Las colonias en TCBS son de un tamaño aproximado de 1-1,5 mm después de una incubación de 24 h, verdes en 2 cepas (VB 8.9<sup>T</sup> y C 8.10) y amarillas en la cepa VB 5.12. Fermentan la glucosa sin producción de gas, reducen nitratos a nitritos y son oxidasa y catalasa positivas. Son sensibles al agente vibriostático O/129 (150  $\mu\text{g}$ /disco) y resistentes a la ampicilina (10 $\mu\text{g}$ /disco). Todas las cepas crecen a 4°C y necesitan NaCl para crecer, con una concentración óptima del 1 al 3% (p/v), pero no crecen a concentraciones superiores de 6% de NaCl. No son luminiscentes. Todas las cepas son negativas para las pruebas arginina dihidrolasa, lisina y ornitina decarboxilasa, VP, utilización de citrato y urea. Son positivas para las pruebas del indol, rojo metilo, DNasa y esculina. Todas las cepas hidrolizan almidón, gelatina y Tween 80 pero no alginato. Fermentan las siguientes fuentes de carbono: glicerol, D-ribosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, D-manitol, N-acetil-glucosamina, D-celobiosa, D-maltosa, D-trealosa, glucógeno, gluconato potásico y 2-cetogluconato-potásico. Ninguna cepa fermenta eritritol, D-arabinosa, L-arabinosa, D-xilosa, L-xilosa, D- adonitol, metil- $\beta$ -D-xilopranosida, D-galactosa, L-sorbosa, L-ramnosa, dulcitol, inositol, D-sorbitol, metil- $\alpha$ -D-mannopyranosida, metil- $\alpha$ -D-glucopyranosida, arbutina, salicina, D-lactosa, D-melibiosa, inulina, D-melezitosa, D-rafinosa, D-turanosa, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, L-fucosa, D-arabitol, L-arabitol y 5-cetogluconato-potásico. La cepa tipo VB 8.9<sup>T</sup> (=CECT 7244<sup>T</sup> = LMG 24045<sup>T</sup>), aislada de almeja (*Ruditapes philippinarum*), fermenta la gentiobiosa pero no fermenta la D-sacarosa ni la amigdalina.

### 5.3.3. *Aliivibrio finisterrae* sp. nov.

#### 5.3.3.1. Caracterización fenotípica.

##### Metodología clásica.

Todos los aislados son bacilos móviles, anaerobios facultativos, Gram negativos, oxidasa positivos, sensibles al agente vibriostático O/129 (150 µg/disco) y resistentes a la ampicilina (10 µg/disco). Acidifican la glucosa pero no producen gas y son positivos para la actividad DNasa y la prueba de rojo metilo. Son positivos para la arginina dihidrolasa y lisina decarboxilasa, pero negativos para la ornitina decarboxilasa y las pruebas del indol, VP, gelatinasa, amilasa, alginasa y citrato. Crecen a 4°C pero no a 37°C, y al 6% de NaCl con excepción de la cepa VB 14.7. Presentan características fenotípicas variables en 15 pruebas. La cepa C 17.13 es la más diferente desde el punto de vista fenotípico, siendo más reactiva que el resto; es sacarosa y manitol positiva, y negativa para la hidrólisis de urea, al contrario que el resto de los aislados de la especie.

##### Sistemas miniaturizados.

De nuevo, los perfiles de los aislados obtenidos con el sistema API 20E fueron homogéneos en tres cepas mientras que el aislado C 17.13, a diferencia del resto, resultó positivo en las pruebas de la lisina decarboxilasa, indol, fermentación del manitol y sacarosa. Las reacciones positivas en todas las cepas fueron β-galactosidasa, arginina dihidrolasa, fermentación de la glucosa y amigdalina. Los ensayos de la urea y lisina decarboxilasa resultaron negativos en el sistema API discrepando con los resultados obtenidos por la metodología clásica en tubos. También hay discrepancias en la prueba del indol para la cepa C 17.13, positiva en el API 20E pero negativa en tubo. En la Figura 5.30A se muestran los resultados del sistema API 20E para la cepa tipo CMJ 11.1<sup>T</sup> y la cepa C 17.13.

En el sistema API ZYM, tres cepas (CMJ 11.1, VB 14.7 y C 13.19) fueron positivas en las reacciones fosfatasa alcalina, esterasa, esterasa lipasa y leucina arilamidasa. La cepa tipo (CMJ 11.1<sup>T</sup>) fue además positiva para la enzima N-acétil-β-glucosaminidasa. La cepa C 17.13 se mostró más reactiva, produciendo las enzimas fosfatasa alcalina, esterasa, esterasa lipasa,

lipasa, leucina arilamidasa, tripsina, fosfatasa ácida y naftol-AS- $\beta$ I-fosfohidrolasa. La figura 5.30B muestra los resultados de la cepa tipo.

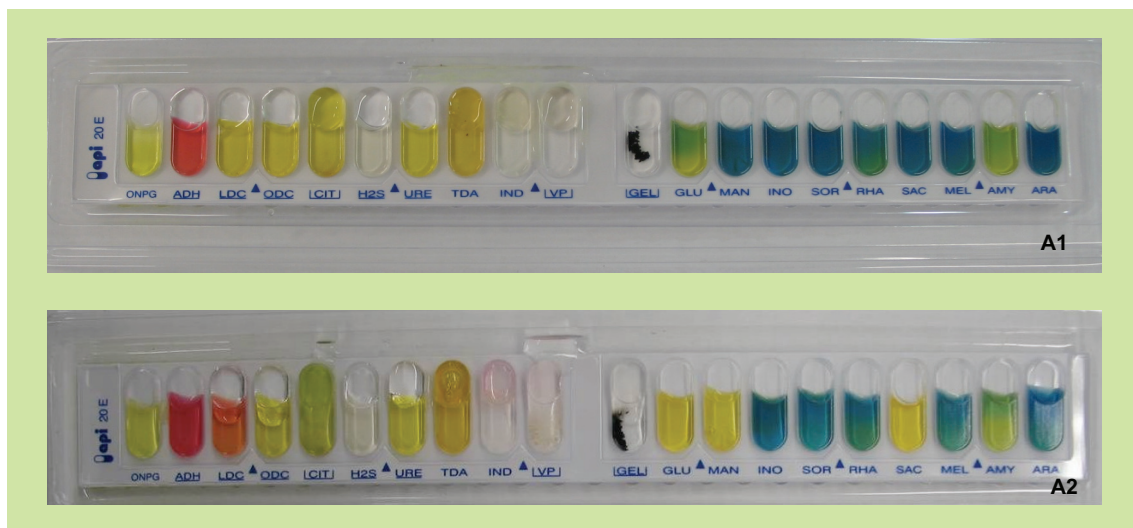
Los resultados del API 50CH fueron homogéneos (Figura 5.31), excepto en 7 de las 49 pruebas realizadas. En este caso también se observa una mayor reactividad para la cepa C17.13 con resultados positivos para la D-sacarosa, D-trealosa, almidón, glucógeno y gluconato potásico (Tabla 5.10).

La Tabla 5.11 resume las características variables entre aislados de *A. finisterrae*, según los resultados obtenidos a partir de pruebas clásicas y sistemas multiprueba API.

#### *5.3.3.2. Diferenciación fenotípica con especies cercanas.*

Las pruebas fenotípicas útiles para discriminar *A. finisterrae* de otras especies de *Aliivibrio* se muestran en la Tabla 5.12. Las cepas de *A. finisterrae* no crecen en medios al 0.5% NaCl y son positivas para la arginina dihidrolasa, al contrario que las otras especies de *Aliivibrio*. La prueba de la urea es positiva para tres de las cuatro cepas de *A. finisterrae* pero negativa para el resto de las especies del género.

(A)



(B)



**Figura 5.30.** Resultados de los sistemas miniaturizados de cepas de *A. finisterrae*: **(A)** API 20E de las cepas CMJ 11.1<sup>T</sup> (A1), y C 17.13 (A3); **(B)** API ZYM de las cepas CMJ 11.1<sup>T</sup> (B1) y C 17.13 (B2).





**Figura 5.31.** Resultados del sistema miniaturizado API 50CH de la cepa tipo de *A. finisterrae*, CMJ 11.1<sup>T</sup>.

**Tabla 5.10.** Resultados de fermentación de diferentes fuentes de carbono por las 3 cepas *Aliivibrio finisterrae* sp. nov. obtenidos con el sistema miniaturizado API 50CH.

Fuente de carbono		CMJ 11.1 <sup>T</sup>	C 13.19	VB 14.7	C 17.13
GLY	glicerol	+	+	+	+
ERY	eritritol	-	-	-	-
DARA	D-arabinosa	-	-	-	-
LARA	L-arabinosa	-	-	-	-
RIB	D-ribosa	+	+	+	+
DXYL	D-xilosa	-	-	-	-
LXYL	L-xilosa	-	-	-	-
ADO	D-adonitol	-	-	-	-
MDX	Meti-β-D-xilopiranosida	-	-	-	-
GAL	D-galactosa	+	+	+	+
GLU	D-glucosa	+	+	+	+
FRU	D-fructosa	+	+	+	+
MNE	D-manosa	+	+	+	+
SBE	L-sorbosa	-	-	-	-
RHA	L-ramnosa	-	-	-	-
DUL	dulcitol	-	-	-	-
INO	inositol	-	-	-	-
MAN	D-manitol	-	-	-	+
SOR	D-sorbitol	-	-	-	-
MDM	metil-α-D-manopiranosida	-	-	-	-
NDG	metil-α-D-glucopiranosida	-	-	-	-
NAG	N-acetil-glucosamina	+	+	+	+
AMY	amigdalina	-	-	-	-
ARB	arbutina	-	+	-	-
ESC	esculina	+	+	+	+
SAL	salicina	+	+	+	+
CEL	D-celobiosa	+	+	+	+
MAL	D-maltosa	+	+	+	+
LAC	D-lactosa	+	+	+	-
MEL	D-melibiosa	+	-	-	-
SAC	D-sacarosa	-	-	-	+
TRE	D-trealosa	-	-	-	+
INU	inulina	-	-	-	-
MLZ	D-melezitosa	-	-	-	-
RAF	D-rafinosa	-	-	-	-
AMD	almidón	-	-	-	+
GLYG	glucógeno	-	-	-	+
XLT	xilitol	-	-	-	-
GEN	gentiobiosa	+	+	+	-
TUR	D-turanosa	-	-	-	-
LYX	D-lixosa	-	-	-	-
TAG	D-tagatosa	-	-	-	-
DFUC	D-fucosa	-	-	-	-
LFUC	L-fucosa	-	-	-	-
DARL	D-arabitol	-	-	-	-
LARL	L-arabitol	-	-	-	-
GNT	gluconato potásico	-	-	-	+
2KG	2-cetogluconato potásico	-	-	-	-
5KG	5-cetogluconato potásico	-	-	-	-

**Tabla 5.11.** Características fenotípicas variables para las cepas de *Aliivibrio finisterrae* sp. nov.

Prueba	CMJ 11.1 <sup>T</sup>	C 13.19	VB 14.7	C 17.13
Urea	+	+	+	-
Crecimiento al 6% NaCl	+	+	-	+
Lipasa	+	-	+	+
<u>Producción de ácido de:</u>				
D-manitol	-	-	-	+
Arbutina	-	+	-	-
D-sacarosa	-	-	-	+
D-melibiosa	+	-	-	-
Almidón	-	-	-	+
Glucógeno	-	-	-	+
Gluconato potásico	-	-	-	+
D-lactosa	+	+	+	-
D-trealosa	-	-	-	+
Gentiobiosa	+	+	+	-
<u>API ZYM</u>				
Lipasa (C4)	-	-	-	+
Tripsina	-	-	-	+
Fosfatasa ácida	-	-	-	+
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	-	-	-	+
N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa	+	-	-	+

**Tabla 5.12.** Características fenotípicas diferenciales de *A. finisterrae* frente a otras especies de *Aliivibrio*.

Prueba	1	2	3	4	5
<u>Producción de</u>					
Arginina dihidrolasa	+	-	-	-	-
Lisina decarboxilasa	+	+	-	+	-
Indol	-	+	+	-	-
Urea	V+ (75)	-	-	V-	-
Voges-Proskauer	-	+	-	-	-
Rojo Metilo	+	-	+	V+	-
<u>Degradación de:</u>					
Almidón	-	-	+	-	-
Gelatina	-	-	+	-	-
Tween 80	V+ (75)	+	+	+	-
<u>Producción de ácido de:</u>					
Celobiosa	+	-	-	+	-
Glicerol	+	-	+	+	+
D-manitol	V- (25)	+	V-	V+	+
D-manosa	+	-	+	+	+
Salicina	+	+	-	V+	-
Sacarosa	V- (25)	+	+	V-	-
Trealosa	V-(25)	-	+	+	+
<u>Crecimiento en Na Cl:</u>					
0,5%	-	+	+	+	+
5%	V+ (75)	+	+	+	+
7%	-	+	V	-	-
<u>Crecimiento a:</u>					
4°C	+	-	+	+	+
25°C	+	+	+	V-	-
<u>API ZYM:</u>					
Butirato esterasa	-	-	+	+	V+
Leucina arilamidasa	+	+	+	+	-
Valina arilamidasa	-	-	+	-	-
Tripsina	V- (25)	-	-	-	-
Fosfatasa ácida	V- (25)	+	V	+	+
Naftol-AS-βI-fosfohidrolasa	V- (25)	+	+	+	+

Taxa (especie/cepa): 1, *A. finisterrae* (4 cepas) 2, *A. fischeri*; 3, *A. wodanis*; 4, *A. logei*; 5, *A. salmonicida*. V +, variable pero la cepa tipo es positiva (porcentaje de cepas positivas); V -, variable pero la cepa tipo es negativa (porcentaje de cepas positivas). Todas las cepas son positivas para la catalasa, oxidasa, movilidad, crecimiento a 15°C y al 3% NaCl, sensibles al agente vibriostático y a la ampicilina, degradan el DNA, y fermentan la D-glucosa. Todas las cepas son negativas para las pruebas del Gram, ornitina decarboxilasa, degradación del alginato, producción de ácido del inositol, L-arabinosa, melibiosa, rafinosa, L-ramnosa, D-sorbitol y D-xilosa, producción de cisteína arilamidasa, α-quimotripsinasa, α-glucosidasa, β-glucosidasa, β-glucoronidasa, α-manosidasa y α-fucosidasa. Datos de Lunder y col. (2000).

#### 5.3.3.3. Microscopía electrónica.

Las células de *A. finisterrae* son bacilos grandes con presencia de un flagelo polar. El tamaño es variable en un rango de 0,80-1,05  $\mu\text{m}$  de anchura por 1,36-2,15  $\mu\text{m}$  de longitud. Se observó la presencia del flagelo y cápsula mediante la microscopía electrónica de transmisión. Los flagelos del *Aliivibrio* no se pudieron observar en la microscopía de barrido debido probablemente a su destrucción durante el procesado de las muestras (Figura 5.32).

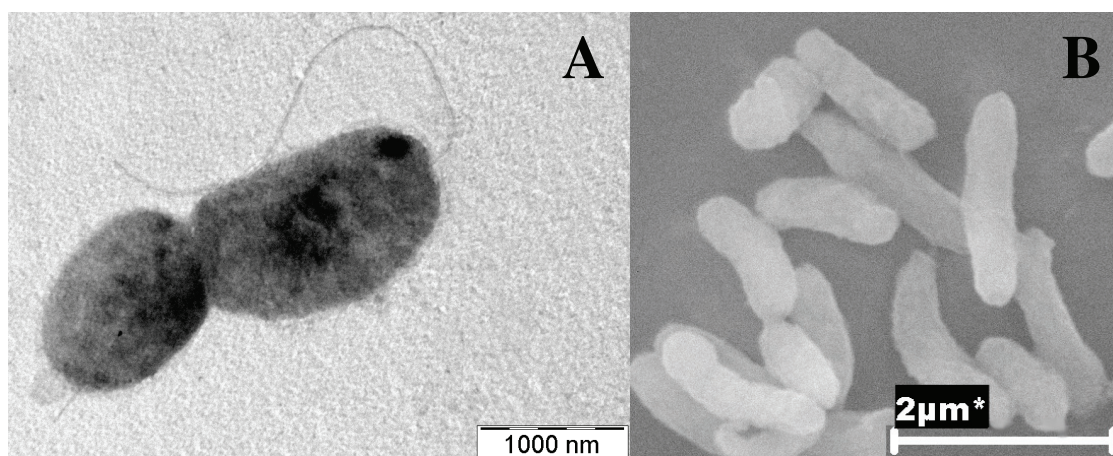


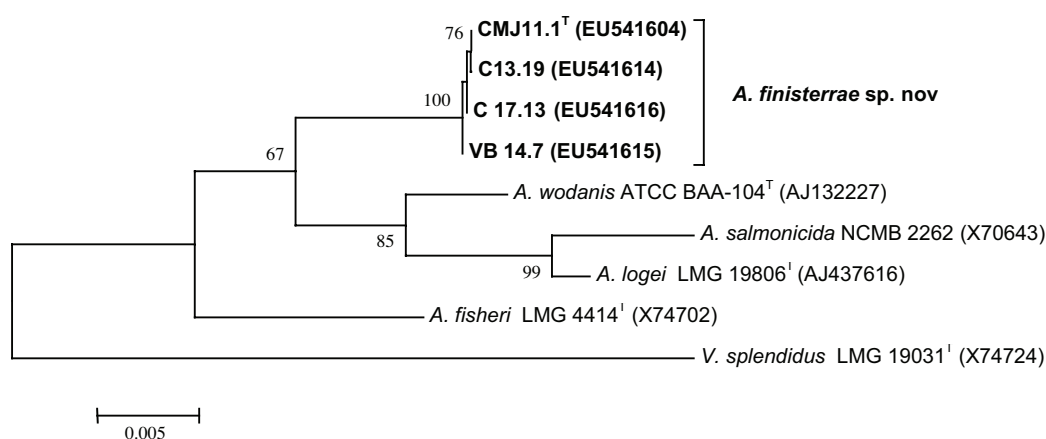
Figura 5.32. (A) Fotografía electrónica de transmisión de la cepa tipo de *A. finisterrae* CMJ 11.1<sup>T</sup>. (B) Fotografía electrónica de barrido de la cepa tipo de *A. finisterrae* CMJ 11.1<sup>T</sup>.

#### 5.3.3.4. Análisis filogenético.

##### Gen 16S rRNA.

Los resultados del análisis filogenético basado en el gen 16S rRNA demuestran que las cepas pertenecen al subgrupo 3 de las *Proteobacterias*. Se confirma el agrupamiento de las cuatro cepas de *A. finisterrae*, CMJ 11.1<sup>T</sup>, VB 14.7, C 13.19 y C 17.13, con valores de “bootstrap” del 100%, y se diferencian claramente de las especies más semejantes desde el punto de vista filogenético (Figura 5.33). Las cepas entre sí poseen valores de similitud mayores del 99,9%. Las similitudes de la cepa tipo con congéneres

cercanos son 98,1% con *A. fischeri* (NVI 88/441<sup>T</sup>), 97,8% con *A. logei* (NCIMB 2252<sup>T</sup>), 97,1% con *A. fischeri* (ATCC 7744<sup>T</sup>) y 96,0% con *A. salmonicida* (NCMB 2262<sup>T</sup>). Con estos porcentajes podríamos discriminar nuestros aislados de otras especies de *Aliivibrio*, ya que el valor mas alto (98,1%), es inferior al límite establecido por Stackbrandt y Ebbers (2006) para diferenciar entre especies.



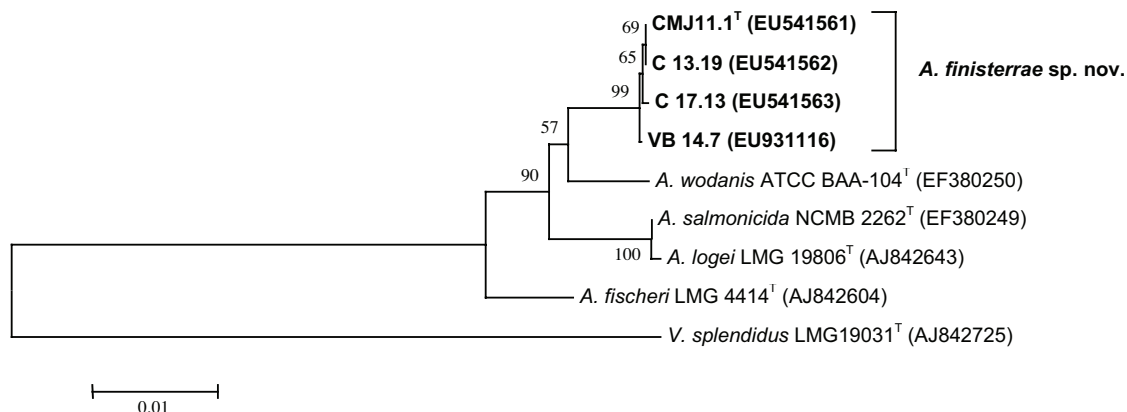
**Figura. 5.33.** Árbol filogenético construido con secuencias del gen 16S rRNA de 4 cepas de *A. finisterrae*, y con especies más próximas. Se utiliza como “outgroup” *V. splendidus*. La longitud de las ramas horizontales es proporcional a la divergencia evolutiva. Los valores de “bootstrap” (>50%) de 1000 réplicas aparecen próximos a la rama correspondiente.

#### Genes “housekeeping”.

En este caso también se secuenciaron los 4 genes “housekeeping” para la verificación de la posición taxonómica de *A. finisterrae*. La Tabla 5.13 muestra todos los porcentajes de similitud de *A. finisterrae* con las especies del género *Aliivibrio* para el gen 16S rRNA y los cuatro genes “housekeeping”. En todos los árboles se observa el agrupamiento de los aislados de *A. finisterrae*, con valores de “bootstrap” del 100%, y su separación del resto de las especies (Figuras 5.34, 5.35 y 5.36).

### *rpoA*

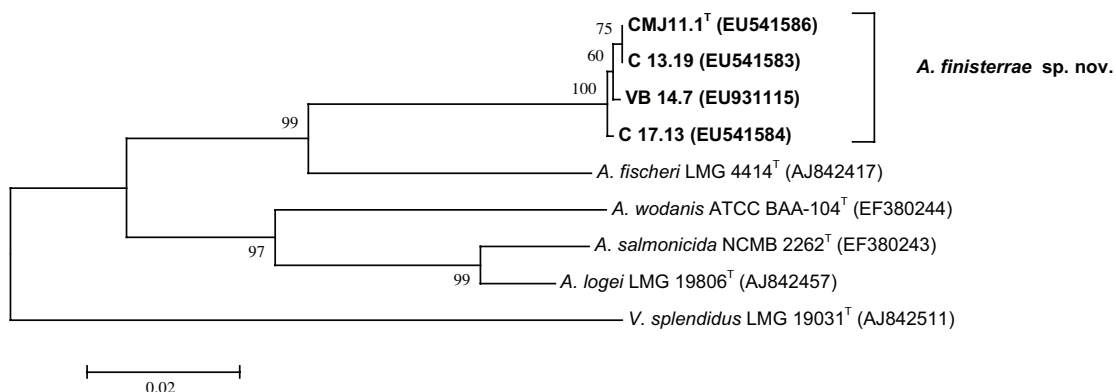
Los valores de similitud de la cepa tipo de *A. finisterrae* CMJ 11.1<sup>T</sup> y otros aliivibrios oscilan entre el 98,1% con *A. wodanis* ATCC BAA-104<sup>T</sup> y 97,2% con *A. fischeri* ATCC 7744<sup>T</sup>.



**Figura. 5.34.** Árbol filogenético construido con secuencias del gen *rpoA* de cepas de *A. finisterrae*, y con especies del género *Aliivibrio*. Características igual que en la Figura 5.33.

### *recA*

En este caso los valores de similitud oscilan entre 89.0% (CMJ 11.1<sup>T</sup> y *A. fischeri* LMG 4414<sup>T</sup>) y 81.0% (CMJ 11.1<sup>T</sup> y *A. salmonicida* NCMB 2262<sup>T</sup>).

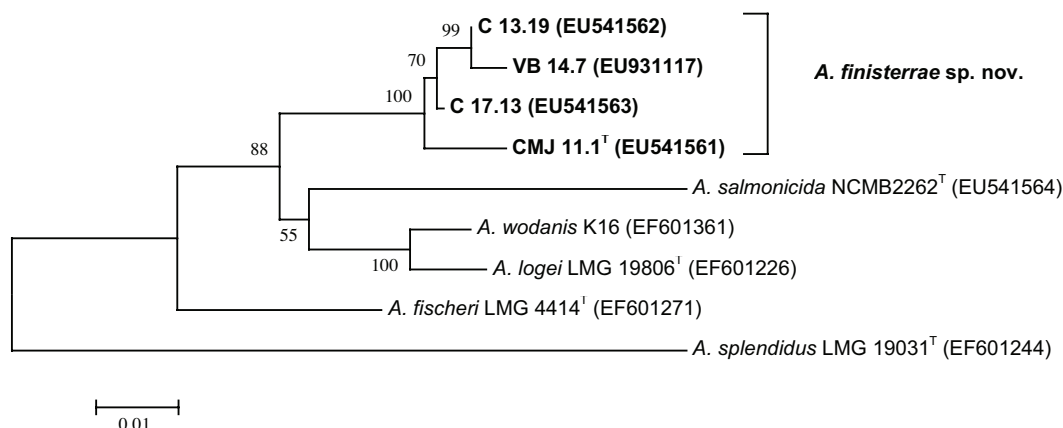


**Figura. 5.35.** Árbol filogenético construido con secuencias del gen *recA* de cepas de *A. finisterrae*, y con especies del género *Aliivibrio*. Características igual que en la Figura 5.33.



### *atpA*

Con el gen *atpA* los valores de similitud de *A. finisterrae* y otras especies dentro del género oscilan entre 95,1% (CMJ 11.1<sup>T</sup> and *A. wodanis* K16) y 92,0% (CMJ 11.1<sup>T</sup> and *A. salmonicida* NCMB 2262<sup>T</sup>).



**Figura. 5.36.** Árbol filogenético construido con secuencias del gen *atpA* de cepas de *A. finisterrae*, y con especies del género *Aliivibrio*. Características igual que en la Figura 5.25.

### *pyrH*

Sólo se encontró la secuencia de este gen para *A. fischeri*, y se secuenció para *A. logei*, por lo que no hubo datos suficientes para un árbol filogenético. Los porcentajes se observan en la tabla 5.13.

**Tabla 5.13.** Resultados de similitud (%) de las secuencias de los genes 16S rRNA, *recA*, *rpoA*, *atpA* y *pyrH* de la cepa CMJ 11.1<sup>T</sup> y especies de *Aliivibrio*.

		CMJ 11.1 <sup>T</sup>				
Cepas tipo		16S	<i>recA</i>	<i>rpoA</i>	<i>atpA</i>	<i>pyrH</i>
<i>A. wodanis</i>	ATCC BAA-104 <sup>T</sup>	98,1	82,0	98,1	95,2	90,0
<i>A. logei</i>	LMG 19806 <sup>T</sup>	97,8	82,0	97,4	95,0	89,0
<i>A. fischeri</i>	LMG 4414 <sup>T</sup>	97,1	89,0	97,2	93,8	87,0
<i>A. salmonicida</i>	NCMB 2262 <sup>T</sup>	96,0	81,0	97,5	92,0	90,0



Selección de un marcador filogenético.

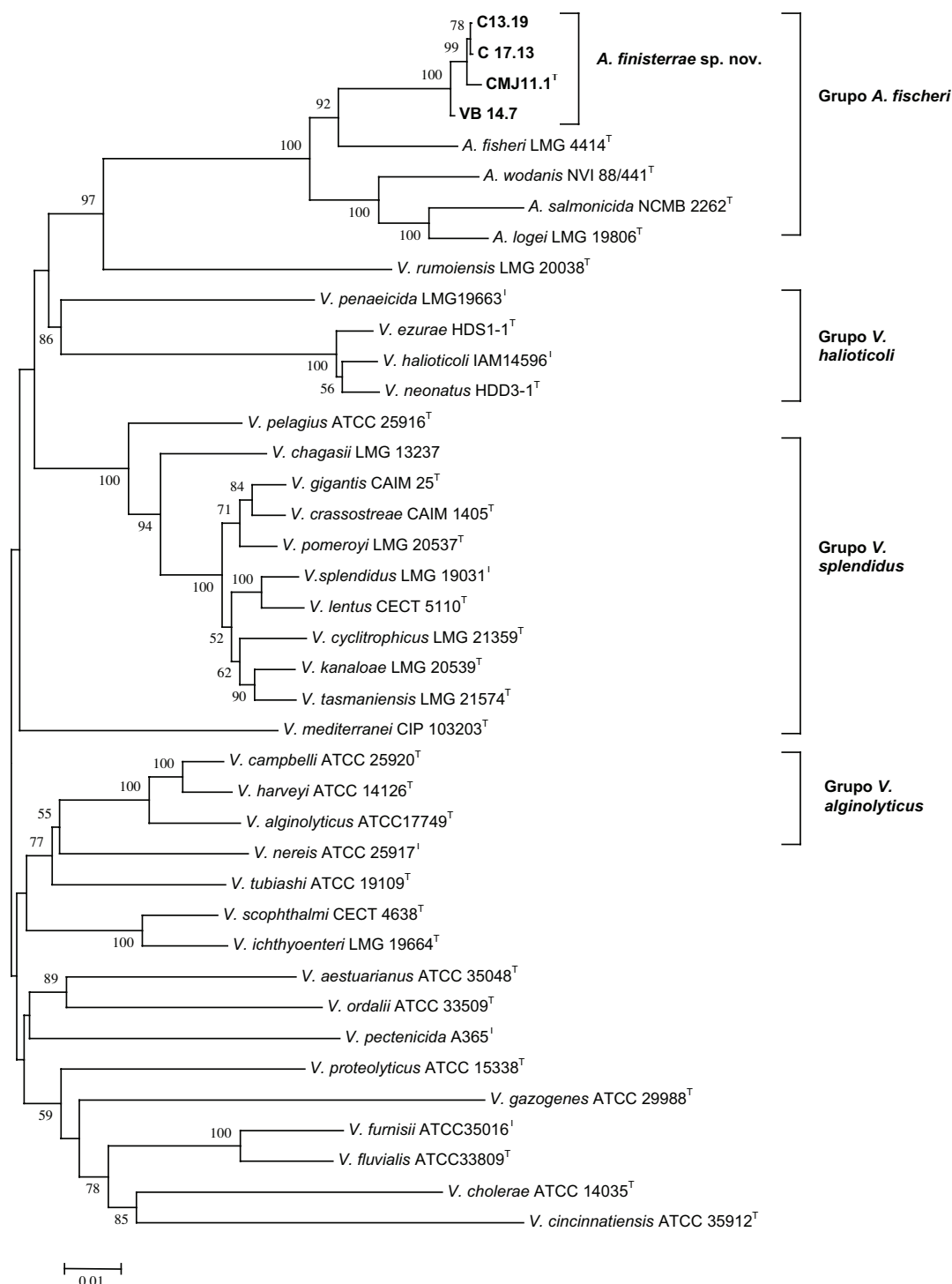
Los árboles filogenéticos del gen 16S rRNA y tres genes “housekeeping” (*rpoA*, *recA* y *atpA*) secuenciados son similares, las cepas de *A. finisterrae* se agrupan en una rama diferente con máximos valores de “bootstrap” y se diferencian del resto de las especies dentro del género *Aliivibrio*. En este caso el gen más discriminativo en valores de similitud es el *recA*. Cualquiera de los 3 genes “housekeeping” serviría como marcador filogenético, aún así la amplificación de todos ellos mediante la técnica de MLSA refuerza la posición taxonómica de la nueva especie.

Genes concatenados.

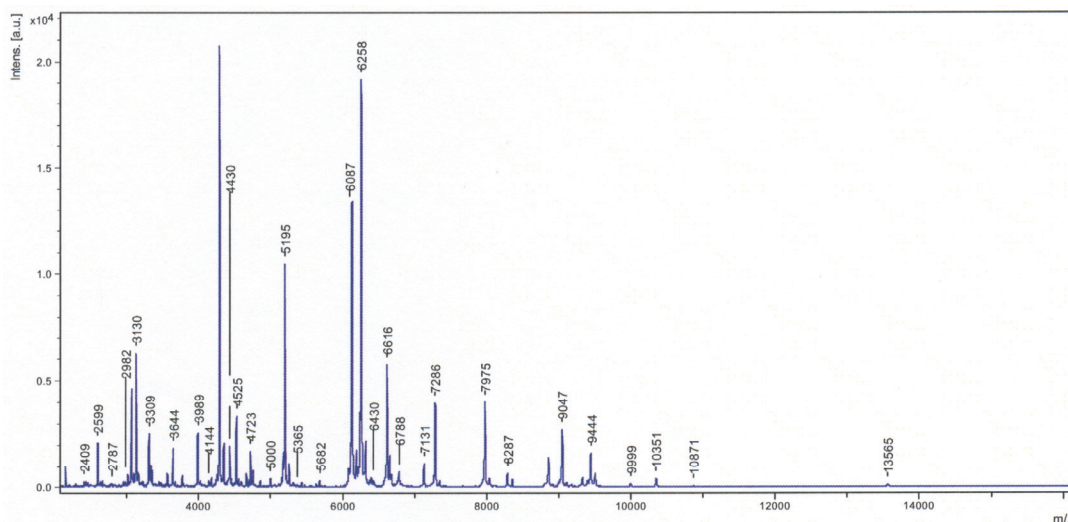
La posición taxonómica de *A. finisterrae* con respecto a especies dentro del género *Vibrio* se evaluó mediante un árbol filogenético a partir del concatenado de los genes 16S, *recA*, *rpoA* y *atpA* (Figura 5.37). Se observa que los aislados de la nueva especie forman un grupo separado dentro del género *Aliivibrio*.

*5.3.3.5. MALDI-TOF-MS.*

El perfil de proteínas obtenido mediante la técnica MALDI-TOF-MS para la cepa tipo de *A. finisterrae* se muestra en la Figura 5.38. El espectro de proteínas en la región de masa/carga ( $m/z$ ) comprende valores entre 2000 y 11000. Los  $m/z$  de las proteínas mayoritarias fueron de 3130, 4287, 4430, 5195, 6087, 6258, 6616, 7286 y 7975. El perfil obtenido fue específico y se realizó una correlación con los perfiles de la base de datos. Se obtuvo un valor logarítmico de 2,810 de la cepa CMJ 11.1<sup>T</sup> con ella misma como control positivo. La especie con el perfil proteico más similar fue *A. fischeri* con un valor de 1,700; con el resto de los perfiles se obtuvieron valores <1,440.



**Figura. 5.37.** Árbol filogenético construido con secuencias concatenadas de los genes 16S rRNA, *rpoA* y *recA* de 3 cepas de *A. finisterrae*, 31 cepas tipo del género *Vibrio* y 4 del género *Aliivibrio*. Características igual que en la Figura 5.33.

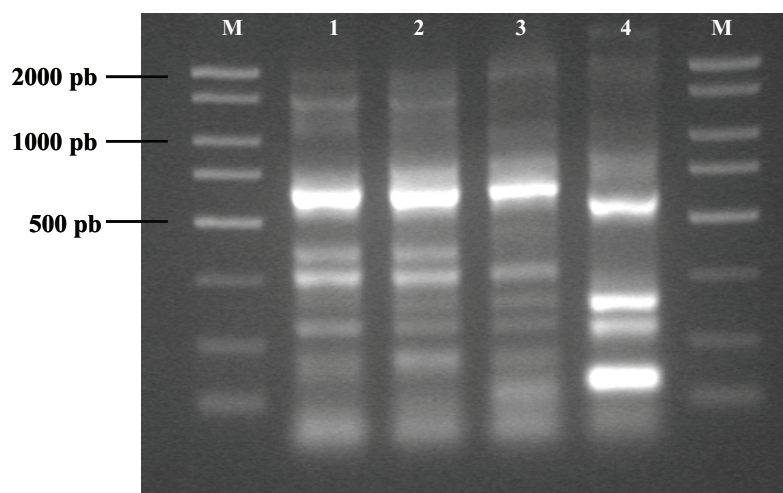


**Figura 5.38.** Perfil de proteínas de la cepa tipo de *A. finisterrae*, CMJ 11.1<sup>T</sup> obtenido mediante la técnica MALDI-TOF-MS.

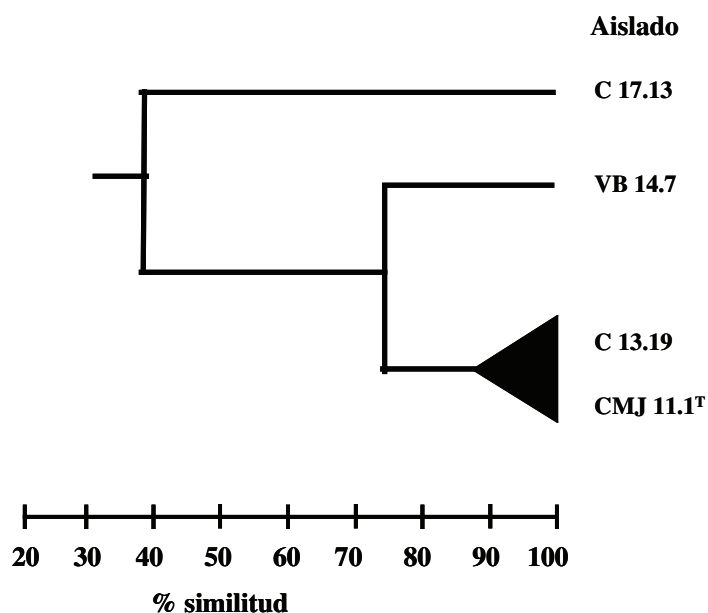
#### 5.3.2.7. Análisis por ERIC y REP-PCR de *A. finisterrae* sp. nov.

Mediante la técnica de REP-PCR se obtuvieron de 6 a 10 bandas entre 150 y 2000 pb. Se obtuvo un cluster de dos cepas, incluyendo la cepa tipo con porcentajes de similitud superiores al 90%. El patrón de la cepa VB 14.7 presentó 75% de homología con respecto al cluster. La cepa genéticamente más diferente fue la C 17.13 con 40% de similitud con respecto al resto de los aislados. (Figuras 5.39 y 5.40).

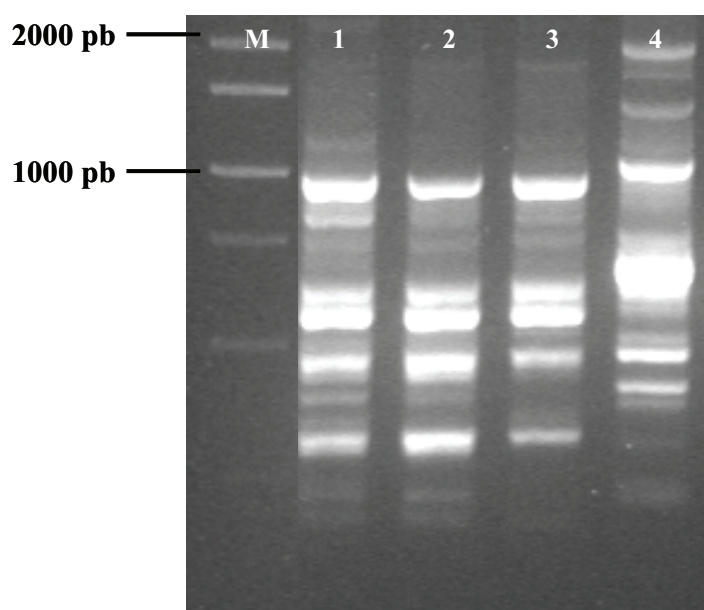
Mediante la técnica de ERIC-PCR se obtuvieron un mayor número de bandas en los patrones (entre 7 y 11 dependiendo del aislado) pero los resultados son prácticamente iguales con variaciones en los porcentajes de similitud. Se obtuvo el mismo cluster de dos cepas obtenido mediante la técnica de REP-PCR con porcentajes de similitud superiores al 90%. La cepa VB 14.7 presentó 82% de homología con el cluster y la cepa C 17.13 presentó el 30% con respecto al resto de las cepas. (Figuras 5.41 y 5.42).



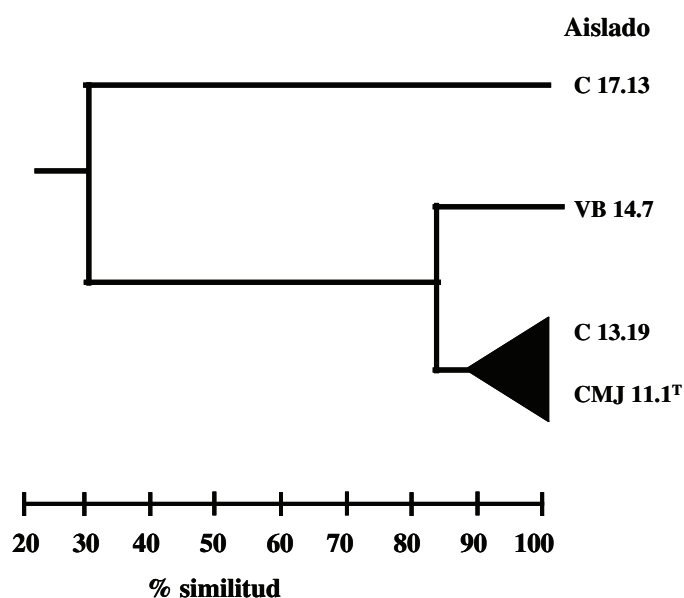
**Figura 5.39.** Patrones de REP-PCR de 3 aislados de *A. finisterrae* sp. nov. M, marcador de peso molecular (50-2000 pb; Sigma); **1**, CMJ 11.1<sup>T</sup>; **2**, c 13.19; **3**, VB 14.7, **4**, C 17.13.



**Figura 5.40.** Dendrograma de similitud entre perfiles de REP-PCR de *A. finisterrae* sp. nov., obtenido mediante el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA.



**Figura 5.41.** Patrones de ERIC-PCR de 3 aislados de *A. finisterrae* sp. nov. M, marcador de peso molecular (50-2000 pb; Sigma); **1**, CMJ 11.1<sup>T</sup>; **2**, C 13.19; **3**, VB 14.7, **4**, C 17.13.



**Figura 5.42.** Dendrograma de similitud entre perfiles de ERIC-PCR de *A. finisterrae* sp. nov., obtenido mediante el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA.

### 5.3.3.6. Descripción de *Aliivibrio finisterrae* sp. nov.

*Aliivibrio finisterrae* [fi. nis. te. rrae, finisterrae del fin del mundo. Galicia era el confín del imperio Romano por el Oeste]

Las cepas aisladas de *Aliivibrio* son Gram negativas, móviles y anaerobias facultativas. Su tamaño es 0,8-1,0  $\mu\text{m}$  x 2,0  $\mu\text{m}$ . En AM las colonias son traslúcidas, no producen “swarming”, y después de 24 h de incubación tienen un diámetro de 0,3-0,5mm. En TCBS las colonias son verdes, menos la cepa C 17.13 que fermenta la sacarosa y sus colonias son amarillas. La concentración óptima de NaCl es 1-3%. Todas las cepas son positivas para las pruebas arginina dihidrolasa, lisina decarboxilasa,  $\beta$ -galactosidasa, DNasa y esculina. Tres de las cuatro especies son positivas para la prueba de la urea y lipasa. No son luminiscentes. Fermentan las siguientes fuentes de carbono: glicerol, D-glucosa, D-ribosa, D-galactosa, D-fructosa, D-manosa, N-acetil-glucosamina, salicina, D-celobiosa, D-maltosa, D-lactosa y D-gentiobiosa. Ninguna cepa fermenta eritritol, D-arabinosa, L-arabinosa, D-xilosa, L-xilosa, D-adonitol, metil- $\beta$ -D-xilopranosida, L-sorbosa, L-ramnosa, dulcitol, inositol, D-manitol, D-sorbitol, metil- $\alpha$ -D-manopiranosida, metil- $\alpha$ -D-glucopiranosida, amigdalina, D-sacarosa, D-trealosa, inulin, D-melezitosa, D-rafinosa, almidón, glucógeno, xilitol, D turanosa, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, L-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, gluconato potásico, 2- cetogluconato potásico y 5-cetogluconato potásico. La cepa tipo CMJ 11.1<sup>T</sup> (= CECT 7228<sup>T</sup> = LMG 23869<sup>T</sup>), aislada de almeja (*Ruditapes philippinarum*), fermenta la D-melibiosa, crece al 6% NaCl y es positiva para la urea y N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa.

## 5.4. DISCUSIÓN.

Las características fenotípicas de los vibrios tienen un importante papel en los sistemas de clasificación bacteriana (Baumann y col. 1984, Farmer y Hickman-Brener 1992), pero cuantas más especies se descubren se observa una mayor variabilidad inter- e intraespecífica, resultando muy dificultosa la identificación a nivel de especie.

Las características de las cepas de *V. breoganii* fueron homogéneas excepto en 11 pruebas, principalmente fermentación de azúcares. Las pruebas fenotípicas básicas de *V. breoganii* son muy similares a las especies *V. haliotocoli*-like, e idénticas a las descritas hasta el momento para *V. comitans*, con excepción de la DNasa y reacciones enzimáticas del API ZYM. Por tanto la identificación de *V. breoganii* basándose sólo en pruebas fenotípicas no sería fiable.

En el caso de *V. gallaecicus* los resultados de las pruebas fenotípicas realizadas son más homogéneos, con variabilidad sólo en 3 pruebas, entre las que destaca la fermentación de la sacarosa en TCBS. Con respecto a otros vibrios, las características fenotípicas son similares a las de especies del grupo de *V. splendidus*. Además, hay que tener en cuenta que en muchas pruebas estas especies de *Vibrio* son variables, dificultando aún más una identificación correcta.

En *A. finisterrae*, las características son prácticamente iguales para tres cepas, mientras que una de ellas es sacarosa positiva en TCBS, urea negativa y mucho más reactiva en API 20E, API ZYM y API 50CH. Con respecto a otras especies de *Aliivibrio* hay claras diferencias, y debido a los pocos miembros del género es fácil distinguirla, aunque se podría confundir con otras especies del género *Vibrio*. Una característica diferencial que no poseen muchos vibrios pero sí un 75% de las cepas de *A. finisterrae* es la prueba de la urea positiva.

Las tablas basadas en métodos bioquímicos en muchos casos desorientan en el proceso de identificación. Es casi imposible diferenciar muchos de los actuales vibrios, como por ejemplo especies relacionadas con *V. splendidus*, solamente mediante estos métodos. Estos datos nos llevan a la conclusión de que debido a la gran variabilidad fenotípica, es necesario recurrir a los métodos de análisis genómico para lograr una identificación clara y correcta a nivel de especie dentro de la familia *Vibrionaceae*.

Hoy en día, se utiliza una gran variedad de técnicas moleculares para una identificación fiable de vibrios como PCR, ribotipado, AFLP, hibridación DNA-DNA, secuenciación del gen 16S rRNA o la técnica MLSA.

La secuenciación de genes “housekeeping” es una herramienta más en la taxonomía de especies bacterianas. Se han estudiado diversos genes en búsqueda de un marcador filogenético capaz de diferenciar entre especies del género *Vibrio*, como los genes *gapA*, *gyrB*, *recA*, *rpoA*, *pyrH*, *atpA* o *dnaJ* (Thompson y col. 2004a, 2005, 2007, Nhung y col. 2007, Sawabe y col. 2007). Hasta hoy no se ha encontrado un único gen que logre diferenciar bien entre todas las especies de *Vibrio*. Los grados de discriminación varían dependiendo del grupo de vibrios estudiado. Por ejemplo las especies *V. cyclitrophicus*, *V. splendidus*, *V. pomeroyi* y *V. chagasii* poseen cerca de 99% de similitud en el gen *rpoA*, pero sólo del 97% en los genes *recA* y *pyrH* (Thompson y col. 2005). El estudio demuestra que el género *Vibrio* es heterogéneo y polifilético formando grupos claros las especies asociadas a *V. halioticoli*, *V. harveyi*, *V. splendidus* y *V. tubiashii* respectivamente. Estos autores establecen que los genes *rpoA*, *recA* y *pyrH* discriminan más que el gen 16S rRNA, y que cepas de la misma especie deben de tener por lo menos 98, 94 y 94% de similitud para los genes *rpoA*, *recA* y *pyrH* respectivamente.

En un estudio posterior Thompson y col. (2007) demostraron la utilidad del gen *atpA* como marcador filogenético alternativo para la identificación de vibrios. La similitud intraespecífica en este gen es de 99%. También se observa la agrupación de los distintos clados de vibrios que concuerdan con los resultados obtenidos de los estudios anteriores. Los valores de similitud entre especies de los distintos grupos fueron alrededor del 97,5% para *V. splendidus*-like, entre 89 y 99,5% para el clado *V. halioticoli*-like y entre 89 y 93% para las especies *A. fischeri*-like.

En los estudios filogenéticos realizados en nuestro trabajo se observan altos porcentajes de similitud en el gen 16S rRNA de *V. breoganii* con vibrios cercanos, haciendo necesario emplear métodos alternativos para definirla como nueva especie. El análisis



basado en la técnica MLSA demuestra que los genes *atpA* y *pyrH* son buenos candidatos como marcadores filogenéticos. El gen *rpoA* no logra diferenciar *V. breoganii* de *V. superstes*; y en el caso del gen *recA* fue imposible la amplificación del gen en esta especie. La mayor disponibilidad de secuencias del gen *atpA* depositadas en el GenBank refuerza la elección de este gen, aunque no se descarta ampliar la base de datos del *pyrH* para evaluar su potencial diferenciador. Los valores de similitud obtenidos para todos los genes “housekeeping” entre *V. breoganii* y especies relacionadas fueron menores que los límites de especie propuestos. Cuando se realizó un árbol con el concatenado de tres genes “housekeeping” y el 16S rRNA, los grupos de vibrios son congruentes y las cepas de *V. breoganii* se agrupan dentro del clado de *V. haliotocoli*. La combinación de varios genes genera una buena identificación y una posición taxonómica claramente definida de los aislados con respecto a otros vibrios.

Los valores de similitud del gen 16S rRNA para las especies *V. gallaecicus* y *A. finisterrae* son menores que el límite establecido para la diferenciación de especies; aún así se realizó la técnica MLSA para llegar a una identificación más sólida. Para la especie *V. gallaecicus* los genes *recA*, *rpoA* y *pyrH* agrupan las cepas en una rama independiente con valores de “bootstrap” del 100% y lejos de especies cercanas. El gen *atpA* separa el grupo de aislados con valores altos de “bootstrap” (98%), aunque próximo a *V. tasmaniensis*. Algunos de los valores de similitud del gen *rpoA* de *V. gallaecicus* con otros vibrios superan el límite propuesto, por el contrario los valores de los genes *pyrH* y *recA* son inferiores. Se considera el gen *recA* como mejor marcador filogenético para *V. gallaecicus* por la disponibilidad de secuencias en el GenBank, por los valores de similitud (<86.7%) con especies cercanas, y por la posición taxonómica que ilustra el árbol filogenético. El árbol se realizó mediante el concatenado de los genes 16S rRNA, *rpoA* y *recA*, ya que con la incorporación del gen *atpA* las posiciones taxonómicas no eran tan claras. En dicho árbol *V. gallaecicus* se separa en una rama independiente pero dentro del clado de *V. splendidus*.

Finalmente para *A. finisterrae* los genes *recA*, *rpoA* y *atpA* demuestran su valor como marcadores filogenéticos, siendo el *recA* el más discriminativo, con valores de similitud

menores de 89%. Los tres genes “housekeeping” y el gen 16S rRNA concatenados completan la posición taxonómica de la nueva especie dentro del género *Aliivibrio*, distanciada claramente del resto de los vibrios.

Recientemente, la técnica de MALDI-TOF-MS ha sido descrita como una metodología útil para la identificación y caracterización de bacterias (van Baar, 2000, Dickson y col. 2004, Dieckman y col. 2005). El problema en la identificación de microorganismos ambientales mediante esta técnica reside en la falta de bases de datos completas, aunque es de esperar que esta limitación se solucione en un futuro próximo.

Se obtuvieron los perfiles de proteínas de las cepas tipo de las tres nuevas especies y se realizó una correlación en los análisis de los perfiles con una base de datos para verificar que tenían perfiles únicos y discriminativos con respecto a especies cercanas. Dentro de las especies presentes en la base de datos utilizada, los perfiles de proteínas definieron las especies más similares a las tres nuevas especies. En el caso de *V. breoganii* fue *V. superstes*; para *V. gallaecicus* fue *V. gigantis* y para *A. finisterrae* fue *A. fischeri*. La técnica generó patrones discriminativos muy consistentes para los tres microorganismos evaluados, resultando ser una técnica muy robusta. Además los perfiles obtenidos fueron únicos y permitieron diferenciar las tres nuevas especies de las más cercanas.

Si se comparan los datos obtenidos con la técnica de MALDI-TOF-MS con los resultados filogenéticos de la secuenciación de genes, se observa que ambos métodos son complementarios coincidiendo en las especies más similares.

**V. DESCRIPTION OF THREE NEW SPECIES WITHIN *Vibrionaceae*.**

***Vibrio breoganii* sp. nov., a non motile alginolytic marine bacterium within the  
*Vibrio halioticoli* clade**

**Roxana Beaz Hidalgo<sup>1</sup>, Ilse Cleenwerck<sup>2</sup>, Sabela Balboa<sup>1</sup>, Susana Prado<sup>1</sup>,  
Paul de Vos<sup>2</sup>, Jesús L. Romalde<sup>\*1</sup>.**

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. Centro de Investigaciones Biológicas (CIBUS)-Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela. 15782, Santiago de Compostela. Spain.

<sup>2</sup> BCCM/LMG Bacteria Collection, Laboratory of Microbiology, Ghent University, Ghent, Belgium.

Submitted to: **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.**  
July 2008.

Revised Ms. IJS/2008/003434

**Running title:** *Vibrio breoganii* sp. nov.

**Section:** New taxa; **subsection** Proteobacteria.

\* Corresponding author:

Phone: +34-981563100 # 16908

Fax: +34-981596904

E-mail: [jesus.romalde@usc.es](mailto:jesus.romalde@usc.es)

The 16S rRNA gene sequences of *V. breoganii* strains RD 15.11<sup>T</sup> (=CECT 7222<sup>T</sup>, LMG 23858<sup>T</sup>), VB 16.3, C 5.5, RD2G5 (CECT 7367=LMG 24484) and CMJ 13.7 are deposited in GenBank/EMBL under the accession numbers EF599161, EU541611, EU541608, EU541609 and EU541610 respectively. The *recA* gene sequences of *V. breoganii* strains RD 15.11<sup>T</sup>, C 5.5, RD2G5, *V. comitans* LMG 23416<sup>T</sup>, *V. rarus* LMG 23674<sup>T</sup>, *V. inusitatus* LMG 23434<sup>T</sup> and *V. gallicus* LMG 21330<sup>T</sup> are deposited in GenBank/EMBL under the accession numbers EU541585, EU541595, EU541596, EU541597, EU541599, EU541600 and EU541601 respectively. The *rpoA* gene sequences of *V. breoganii* strains RD 15.11<sup>T</sup>, C 5.5, RD2G5, *V. comitans* LMG 23416<sup>T</sup>, *V. rarus* LMG 23674<sup>T</sup>, *V. inusitatus* LMG 23434<sup>T</sup>, *V. gallicus* LMG 21330<sup>T</sup> and *V. superstes* LMG 21323<sup>T</sup> are deposited in GenBank/EMBL under the accession numbers EU541565, EU541575, EU541576, EU541577, EU541578, EU541579, EU541581 and EU541580. The *atpA* gene sequences of *V. breoganii* strains RD 15.11<sup>T</sup>, C 5.5, RD2G5, *V. comitans* LMG 23416<sup>T</sup>, *V. rarus* LMG 23674<sup>T</sup> and *V. inusitatus* LMG 23434<sup>T</sup> are deposited in GenBank/EMBL under the accession numbers EU541550, EU541552, EU541551, EU541553, EU541554 and EU541555 respectively.

Variable phenotypic characteristics for all strains of *Vibrio breoganii* are illustrated in Supplementary Table S1 and a phylogenetic tree based on concatenated sequences of three genes is available as supplementary material in IJSEM Online.

## SUMMARY

Seven non motile, facultative anaerobic, alginolytic marine bacteria were isolated from cultured clams *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus*. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences showed that these marine bacteria were closely related to the recently described species *Vibrio comitans*, *V. rarus* and *V. inusitatus* (> 99.0% 16S rRNA gene sequence similarity). Phylogenetic analysis based on the housekeeping genes, *rpoA*, *recA* and *atpA*, grouped the isolates together and allocated them to the *V. halioticoli* species group. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) DNA fingerprinting also grouped them together and enabled their differentiation from the recognized species of the *V. halioticoli* clade. DNA-DNA hybridizations proved that the isolates belong to a novel species. Phenotypic features such as ability to grow at 4°C and in the presence of 6% NaCl also enables their separation. The G+C content of RD 15.11<sup>T</sup> is 44.4 mol%. The genotypic and phenotypic data evidenced that the isolates represent a novel species in the *V. halioticoli* clade. The name *Vibrio breoganii* sp. nov. is proposed. The type strain is RD 15.11<sup>T</sup> (= CECT 7222<sup>T</sup> = LMG 23858<sup>T</sup>).

During the last decade the number of *Vibrio* species has increased rapidly. At present, there are approximately 70 recognized *Vibrio* species. It is known that these fermentative bacteria constitute an important percentage of the heterotrophic bacteria associated with marine bivalves, especially oysters, mussels and clams (Kueh *et al.*, 1985; Pujalte *et al.*, 1993; Gomez-León *et al.*, 2005). Several *Vibrio* species can be pathogenic and are associated with disease outbreaks (Prado *et al.*, 2005), therefore accurate identification of these microorganisms is important. The technique multilocus sequence analysis (MLSA) has greatly improved the taxonomy of *Vibrionaceae* strains and many of the existent species are assigned to specific groups. These groups are usually named after a representative species in the group like the *splendidus*, *diazotrophicus*, *scophthalmi*, *fischeri*, *harveyi* or *haliotocoli* clades, among others (Thompson *et al.*, 2007, Sawabe *et al.*, 2007b). The species of *V. haliotocoli* clade are found in association with ecological niches in the gut of *Haliotis* spp. and are alginolytic, non motile, unflagellated and fermentative marine bacteria. The *V. haliotocoli* clade consists at present of 8 species: *V. haliotocoli*, *V. superstes*, *V. neonatus*, *V. ezurae*, *V. gallicus*, *V. comitans*, *V. inusitatus* and *V. rarus*. *V. haliotocoli* was first described by Sawabe *et al.* (1998). *V. comitans*, *V. inusitatus* and *V. rarus* were more recently described (Sawabe *et al.*, 2007a). *V. haliotocoli* clade strains have been found all over the world, in Japan (Sawabe *et al.*, 1995, 1998, 2002, 2004a, 2007a), Australia (Hayashi *et al.*, 2003), South Africa (Sawabe *et al.*, 2003) and France (Sawabe *et al.*, 2004b). In this study a set of seven isolates phylogenetically and phenotypically similar to the species of the *V. haliotocoli* clade were isolated from the microbiota of Spanish clams (*Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus*) and are described as a new species. This is the first time that isolates of this clade are obtained from mollusc other than the *Haliotis* species.

Seven isolates of (RD 15.11<sup>T</sup> = CECT 7222<sup>T</sup> = LMG 23858<sup>T</sup>, RD 2G5= CECT 7367= LMG 24484, VB 16.3, C5.5, RD 2B2, C 4.15, and CMJ 13.7) were obtained from cultured clams on the north west coast of Spain (Galicia) during a two year survey from March 2004 to December 2005. Standard bacteriological procedures were employed for analysis of the clams (Prado *et al.*, 2005). Briefly, a total of 15-20 clams, depending on

the size, were aseptically dissected and samples of hepatopancreas, mantle, gonad, gills and extrapalial fluid were collected. Homogenates were prepared by adding a volume of saline solution (0.85%) to the weighed organ samples (1:1). Samples were serially diluted in saline solution (0.85%), plated on marine agar (MA) (Pronadisa, Madrid, Spain) and thiosulphate citrate bile sucrose agar (TCBS, Oxoid Ltd., Basingstoke, UK), and incubated at  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  for 10 days (MA) or 48h (TCBS). Pure cultures of the different colony morphologies were recovered on MA.

Reference strains used, *V. comitans* LMG 23416<sup>T</sup>, *V. rarus* LMG 23674<sup>T</sup>, *V. inusitatus* LMG 23434<sup>T</sup>, *V. ezurae* LMG 19970<sup>T</sup>, *V. neonatus* LMG 19973<sup>T</sup>, *V. gallicus* LMG 21330<sup>T</sup> and *V. superstes* LMG 21323<sup>T</sup> were purchased from the BCCM/LMG Bacteria Collection. All strains were cultured on Marine agar (MA, Pronadisa) by incubation at  $25^\circ\text{C}$  for 24h. All cultures were maintained frozen at  $-80^\circ\text{C}$  in Marine Broth (Pronadisa) supplemented with 15% glycerol (v/v).

Phenotypic characteristics were determined by standard methods and by commercial miniaturized kits: API 50CH, API 20E and API ZYM (BioMerieux SA, France). API 50CH was tested with slight modifications as previously reported (Prado, 2006). Briefly, bacterial suspensions were prepared in saline solution (SS, 0.85%), adjusted to an optical density of 1,0 at 580 nm and mixed with the media ZOF (Lemos *et al.*, 1985) (1/10 v/v) prior to the inoculation of the galleries. Readings were taken at 24, 48, 96 and 120 h and after 6 days. The readings after 6 days of incubation were used for comparison. For API 20E and API ZYM, the standard methodologies were used except that the media used for the bacterial suspension was SS. In all cases, incubation was done at  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ . Routine phenotypic tests were performed following the methodologies described by Lemos *et al.* (1985), West *et al.* (1986), Romalde & Toranzo (1991), and MacFaddin (1993). All media were supplemented with 1% NaCl when required. The absence of flagellar arrangement was determined after staining cell from cultures grown on MA by the method of Heimbrook *et al.* (1989).

The seven clam isolates examined in this study shared the main phenotypic and chemotaxonomic features of the genus *Vibrio* except for the absence of flagella (Farmer 1992). The strains were facultative anaerobic, non-motile, Gram negative and oxidase positive. They required salt for growth, grew on TCBS, were susceptible to the



vibriostatic agent O/129 (150 µg per disc), and reduced nitrates to nitrites. The seven isolates were phenotypically homogeneous in the tests performed except for eleven variable traits (Supplementary Table S1).

Genomic DNA for sequencing was extracted as previously described (Prado *et al.*, 2005). Amplification and sequencing of the 16S rRNA gene was performed using the GenomeLab DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter) (Prado *et al.*, 2005). Amplification and sequencing of the housekeeping genes *rpoA*, *recA* and *atpA* were performed according to Thompson *et al.* (2004, 2005, 2007). For the reference strains sequences were retrieved from EMBL, unless they were not available. In that case sequences were determined in this study. Sequence data analysis was performed with DNASTar Lasergene Seqman program (Madison, WI, USA). Sequences of the isolates were subjected to a BLAST search against the latest release of the GenBank. Phylogenetic trees were constructed using the neighbour-joining (NJ) and the maximum parsimony algorithms (Tamura *et al.*, 2007). Distance matrices were calculated using Kimura's two parameter correction and stability of the groupings was estimated by bootstrap analysis (1000 replicates) using the program Mega version 4.0.

Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences revealed that the seven isolates belonged to the gamma subdivision of the phylum *Proteobacteria*. The isolates showed more than 99% 16S rRNA gene sequence similarity among each other and were phylogenetically related to species of the *V. haliotocoli* clade (Fig. 1, Supplementary Fig. S2). RD 15.11<sup>T</sup> showed more than 98% 16S rRNA gene sequence similarity with *V. comitans* (99.4%), *V. inusitatus* (99.2%), *V. rarus* (99.2%), *V. ezurae* (98.9%), *V. haliotocoli* (98.4%), *V. superstes* (98.3%) and *V. neonatus* (98.1%). Recently, sequencing of housekeeping genes has been proven useful to determine phylogenetic relationships among microorganisms. For *Vibrionaceae* different loci such as *gapA*, *gyrB*, *recA*, *rpoA*, *pyrH*, *atpA*, or *dnaJ* have been studied in search for a useful phylogenetic marker capable of delineating among *Vibrio* species (Thompson *et al.*, 2004, 2005, 2007, Sawabe *et al.*, 2007, Nhung *et al.*, 2007). In the present study fragments of the genes *rpoA* (931 bp), *recA* (613 bp to 713 bp) and *atpA* (1322 bp) were sequenced. According to Thompson *et al.* (2005) strains of the same species will have

at least 98.0% *rpoA* and 94.0% *recA* gene sequence similarity. The similarities between *rpoA* gene sequence of *V. breoganii* (RD 15.11<sup>T</sup>) and *V. comitans* and *V. superstes* were above the intraspecies limit, the other six related species were under the limit. All similarity values for the *recA* gene sequences were under the intraspecies limit (Table 2). Phylogenetic trees based on *rpoA*, *recA* and *atpA* gene sequences confirmed the allocation of the isolates to the *V. halioticoli* clade, enabled their differentiation from the recognized species of this clade and revealed *V. superstes* as the phylogenetically nearest neighbour (Fig. 2).

Genomic DNA for AFLP analysis was extracted using the kit Easy DNA (InVitrogen). AFLP analysis was basically performed as previously described (Thompson *et al.*, 2001), except that dendrograms were constructed using the DICE coefficients and the UPGMA algorithm. AFLP DNA fingerprinting grouped the isolates together and enabled their differentiation from the recognized species of the *V. halioticoli* clade as well as from other vibrios (Beaz- Hidalgo *et al.* 2008).

Genomic DNA for DNA-DNA hybridizations and determination of the DNA G+C content was prepared according to a modification (Cleenwerck *et al.*, 2002) of the procedure of Wilson *et al.* (1987). DNA:DNA hybridizations were performed at 39°C according to a modification (Goris *et al.*, 1998) of the method described by Ezaki *et al.*, (1989). Reciprocal reactions (e.g. A x B and B x A) were performed and were within the limits of this method (Goris *et al.*, 1998). The DNA G+C content of RD 15.11<sup>T</sup> was determined using the method of Mesbah *et al.* (1989). DNA of RD 15.11<sup>T</sup> was hybridized with DNA of the phylogenetically nearest neighbours, RD 15.11<sup>T</sup> showed a DNA relatedness of 58% with *V. superstes* LMG 21323<sup>T</sup>, 36% with *V. comitans* LMG 23416<sup>T</sup>, 28% with *V. inusitatus* LMG 23434<sup>T</sup>, 19% with *V. ezurae* LMG 19970<sup>T</sup>, 18% with *V. neonatus* LMG 19973<sup>T</sup>, 15% with *V. rarus* LMG 23674<sup>T</sup> and 14% with *V. halioticoli* LMG 18542<sup>T</sup>.

The new species can be differentiated from the phylogenetically related species by several features (Table 1). They can be differentiated from *V. superstes* by their ability to grow at 4°C and in 6% NaCl, their positive reaction for the ONPG test and their

inability to produce acid from D-trehalose. With the API ZYM methodology other differences such as the use of butyrate esterase (C4) and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase were found (data not shown). They can be differentiated from *V. inusitatus* by their ability to produce acid from D-galactose and their positive reaction in the ONPG test. They can be differentiated from *V. rarus* by their ability to grow at 4°C, their positive reaction in the ONPG test, their ability to produce acid from amygdalin, D-xylose, D-galactose, esculin and salicin, their inability to produce acid from glycerol and their negative reaction in the indol test. Additionally, the isolates show a positive reaction in the API ZYM tests esterase (C4), esterase lipase (C8), acid phosphatase and Naphthol- AS- BI- phosphohydrolase, contrary to *V. rarus*, *V. inusitatus* and *V. comitans*.

In conclusion, the data presented above clearly support that the seven isolates belong to a novel species in the *Vibrio haliotocoli* clade. The name *Vibrio breoganii* sp. nov. is proposed. The type strain is RD 15.11<sup>T</sup> (= LMG 23858<sup>T</sup>= CECT 7222<sup>T</sup>).

#### **Description of *Vibrio breoganii* sp. nov.**

*Vibrio breoganii* [bre.o.gan' i.i. M. L. masc. gen. n. breoganii from Breogan, a Mithic celtic king of Galicia (NW Spain) from where the strains were isolated].

Strains are Gram negative, facultative anaerobic, non motile and non flagellated rods (0.5-0.75 x 1.0-2.0 µm). They form non-pigmented, translucent, non swarming smooth-rounded colonies 0.3-0.7 mm in diameter on MA plates after 24 hours incubation at 25°C. Not luminescent. Opaque and round 0.7-1.0 mm green colonies are formed on TCBS agar, except for strain RD2G5 with translucent yellow appearance. No growth occurs without NaCl ions in the culture medium. Mesophilic and chemo-organotrophs. Growth occurs at 1.5 – 6.0 % NaCl (w/v) and at 4°C but not at salinities above 8.0% NaCl, or at temperatures above 37°C. All strains are susceptible to the vibriostatic agent O/129 (150 µg per disc), resistant to ampicillin (10 µg per disc) except for one strain (C 5.5). Arginine-dihidrolase, lysine- and ornithine-decarboxylase negative, ferment glucose without producing gas and positive for oxidase and catalase. Reduce nitrates to

nitrites. Indol, urease, Voges-Proskauer, H<sub>2</sub>S, gelatinase, amylase, use of citrate, lipase and DNase tests are all negative. Positive for methyl red, ONPG and alginase activity. API ZYM reaction tests were positive for all strains for alkaline phosphatase, butyrate esterase (C4), esterase lipase (C8), leucine arylamidase, acid phosphatase, Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase and N acetyl- $\beta$ -glucosaminidase. All strains produce acid from D-xylose, D-galactose, D-fructose, D-mannitol, N-ac-glucosamine, amygdalin, esculin, salicine, D-cellobiose, D- maltose, gentiobiose, potassium gluconate, potassium 2-ketogluconate. None of the strains produce acid from glycerol, eritritol, D-arabinose, L-arabinose, D-adonitol, methyl- $\alpha$ D-xylopiranoside, L-sorbose, L-rhamnose, dulcitol, inositol, D-sorbitol, methyl- $\alpha$ D- manopyranoside, methyl- $\alpha$ D-glucopyranoside, D-trehalose, inuline, D-melezitose, D-rafinose, xilitol, D-turanose, D-lixose, D-tagatose, D-fucose, D-arabitol, L-arabitol and potassium 5-ketogluconate. The type strain RD 15.11<sup>T</sup> produces acid from D-melibiose, L-xylose, arbutin, glycogen and D-lactose but not from sucrose, D-ribose, D-mannose and L-rhamnose. The type strain RD 15.11<sup>T</sup> is resistant to ampicillin. Its DNA G+ C content is 44.4 mol%.

The type strain RD 15.11<sup>T</sup> (=CECT 7222<sup>T</sup> = LMG 23858<sup>T</sup>) and six reference strains (RD 2G5 [CECT 7367=LMG 24484], VB 16.3, C5.5, RD 2B2, C 4.15 and CMJ 13.7) were isolated from clams *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* in Galicia, north-west of Spain.

### Acknowledgements

This work was supported in part by a grants AGL2003-09307-C02-01 and AGL2006-13208-C02-01, from the Ministerio de Ciencia y Tecnología and grant PGIDIT04PXIC20001PN from the Xunta de Galicia (Spain). R B.-H. and S.B. acknowledge the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain) for research fellowships.

The research was also supported by the Prime Minister's Services- Federal Office for Scientific, Technical and Cultural Affairs, Belgium. The authors wish to acknowledge Katrien Engelbeen for performing the DNA:DNA hybridizations.

## REFERENCES

- Beaz-Hidalgo R., Cleenwerck I., Balboa S., De Wachter M., Thompson F. L., Swings J., De Vos P. & Romalde J. L. (2008).** Diversity of *Vibrios* associated with reared clams in Galicia (NW Spain). *Syst Appl Microbiol* **31**, 215-222.
- Cleenwerck, I., Vandemeulebroecke, K., Janssens, D. & Swings, J. (2002).** Re-examination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1551-1558.
- Ezaki, T., Hashimoto, Y. & Yabuuchi, E. (1989).** Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridisation in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridisation in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 224-229.
- Farmer III, J. J. (1992).** The family *Vibrionaceae*. In: The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications, pp. 2938-2951. Edited by A. Balows eds. New York, Springer-Verlang.
- Gómez-León, J., Villamil, L., Lemos, M. L. & Novoa, B. (2005).** Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Appl Environ Microbiol* **71**, 98-104.
- Goris, J., Suzuki, K., De Vos, P., Nakase, T. & Kersters, K. (1998).** Evaluation of a microplate DNA-DNA hybridization method compared with the initial renaturation method. *Can J Microbiol* **44**, 1148-1153.
- Hayashi, K., Moriwaki, J., Sawabe, T., Thompson, F.L., Swings, J., Gudkovs, N., Christen, R. & Ezura, Y. (2003).** *Vibrio superstes* sp. nov., isolated from the gut of Australian abalones *Haliotis laevis* and *Haliotis rubra*. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1813-1817.
- Heimbrook, M. E., Wang, W. L. & Campbell, G. (1989).** Staining bacteria flagella easily. *J Clin Microbiol* **27**, 2612-2615.
- Ishimaru, K., Akawa- Matsushita, M. & Muroga, K. (1995).** *Vibrio penaeicida* sp. nov., a pathogen of Kumura prawns (*Penaeus japonicus*). *Int J Syst Bacteriol* **45**, 134-138.

- Khue, C. S. W. & Chan, K. J. (1985).** Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. *J Appl Bacteriol* **59**, 41-47.
- Lemos, M. L., Toranzo, A. E. & Barja, J. L. (1985).** Modified medium for the oxidation-fermentation test in the identification of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* **49**, 1541-1543.
- Mac Faddin, J. F. (1993).** Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. The William & Wilkins Company. Baltimore. Translation by Médica Panamericana S.A.
- Mesbah, M., Premachandran, U. & Whitman, W. B. (1989).** Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 159-167.
- Nhung P. H., Monir Shah M., Ohkusu, K., Noda, M., Hata, H., Song Sun X., Goto K., Masaki T., Miyasaka J. & Ezaki T. (2007).** The *dnaJ* gene as a novel phylogenetic marker for identification of *Vibrio* species. *Sys Appl Microbiol* **30**, 309-315.
- Pujalte, M. J. Ortigosa, M., Urdaci, M. C. Garay, E. & Grimont, P. A. D. (1993).** *Vibrio mytili* sp. nov., from mussels. *Int J Syst Bacteriol* **43**, 358-362.
- Prado, S., Romalde, J. L., Montes, J. & Barja J. L. (2005).** Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. *Dis Aquat Org* **67**, 209-215.
- Prado, 2006.** Microbiota asociada a criaderos de moluscos patogénesis y probiosis. PhD Thesis.
- Romalde, J. L. & Toranzo, A. E. (1991).** Evaluation of the API 20E system for the routine diagnosis of the enteric redmouth disease. *Bull Eur Ass Fish Pathol* **11**, 147-149.
- Thompson, F.L., Hoste B., Vandeneulebroecke K. & Swings J. (2001).** Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different source determined by Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism. *System Appl Microbiol* **24**, 520-538.
- Thompson C. C., Thompson F. L., Vandemeulebroecke, K., Hoste B., Dawyndt, P & Swings J. (2004).** Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family *Vibrionaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 919-929.

- Thompson, F. L., Gevers, D., Thompson, C. C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn C. B. & Swings, J. (2005).** Phylogeny and molecular identification of *Vibrios* on the basis of Multilocus Sequence Analysis. *Appl Environ Microb* **71**, 5107-5115.
- Thompson, C. C., Thompson, F. L., Vicente, A. C. & Swings, J. (2007).** Phylogenetic analysis of vibrios and related species by means of *atpA* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2480-2484.
- Sawabe, T., Oda, Y., Shiomi, Y. & Ezura, Y. (1995).** Alginate degradation by bacteria isolated from the gut of sea urchins and abalones. *Microb Ecol* **30**, 192-202.
- Sawabe, T., Sugimura, I., Ohtsuka, M., Nakano, K., Tajima, K., Ezura, Y. & Christen, R. (1998).** *Vibrio halioticoli* sp. nov., a non-motile alginolytic marine bacterium isolated from the gut of the abalone *Haliotis discus hannai*. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 573-580.
- Sawabe, T., Thompson, F. L., Heyrman, J., Cnockaert, M., Hayashi, K., Tanaka, R., Yoshimizu, M., Hoste, B., Swings, J. & Ezura, Y. (2002).** Fluorescent amplified fragment length polymorphism (FAFLP) and repetitive extragenic palindrome (rep)-PCR fingerprinting reveal host specific-genetic diversity of *Vibrio halioticoli*-like strains isolated from the gut of Japanese abalone. *Appl Environ Microbiol* **68**, 4140-4144.
- Sawabe, T., Setoguchi, N., Inoue, S., Tanaka, R., Ootsubo, M., Yoshimizu, M. & Ezura, Y. (2003).** Acetic acid production of *Vibrio halioticoli* from alginate: a possible role for establishment of abalone- *V. halioticoli* association. *Aquaculture* **219**, 671-679.
- Sawabe, T., Hayashi, K., Moriwaki, J., Fukui, Y., Thompson, F. L., Swings, J. & Christen, R. (2004a).** *Vibrio neonatus* sp. nov., and *Vibrio ezurae* sp. nov. isolated from the gut of Japanese abalones. *Syst Appl Microbiol* **27**, 527-534.
- Sawabe, T., Hayashi, K., Moriwaki, J., Thompson, F. L., Swings, J., Potin, P., Christen, R. & Ezura, Y. (2004b).** *Vibrio gallicus* sp. nov., isolated from the gut of the French abalone *Haliotis tuberculata*. *Int J Sys Evol Microbiol* **54**, 843-846.
- Sawabe, T., Fujimura, Y., Niwa K. & Aono, H. (2007a).** *Vibrio comitans* sp. nov., *Vibrio rarus* sp. nov. and *Vibrio inusitatus* sp. nov. from the gut of the abalones

*Haliotis discus*, *H. gigantean*, *H. madaka* and *H. rufescens*. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 916-922.

**Sawabe, T., Kita- Tsukamoto, K. & Thompson, F.L. (2007b).** Inferring the evolutionary history of *Vibrios* by means of Multilocus Sequence Analysis. *Journal of Bacteriology* **189**, 7932-7936.

**Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007).** MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-1599.

**West, P. A., Brayton, P. R., Bryant, T. N. & Colwell, R. R. (1986).** Numerical taxonomy of *vibrios* isolated from aquatic environments. *Int J Syst Bacteriol* **36**, 531-543.

**Wilson, K. (1987).** Preparation of genomic DNA from bacteria. In *Current Protocols in Molecular Biology*, pp. 2.4.1.-2.4.5. Edited by F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl. New York: Green Publishing and Wiley-Interscience.



**Table 1.** Phenotypic characteristics for distinguishing the novel species *V. breoganii* from phenotypically and phylogenetically related *Vibrio* species (data from type strains obtained in our laboratory).

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Indol	-	-	-	+	+	+	+	+	-
ONPG	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Acid from:									
Amygdalin	+	+	+	-	+	-	-	-	+
Glycerol	-	-	-	+	-	-	+	-	-
D- ribose	+	-	-	-	-	-	+	+	+
D- xylose	+	+	+	-	-	-	-	-	+
D- galactose	+	+	-	-	-	+	-	-	+
Esculin	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Salicin	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	-	-	-	+
D- trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Gentibiose	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Growth at:									
4°C	+	+	+	-	-	-	-	-	-
6%	+	+	+	+	-	-	-	-	-
DNase	-	+	-	-	-	-	-	-	-
API ZYM									
Esterase (C4)	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Esterase lipase (C8)	V+ (6)	-	-	-	-	+	-	+	-
Acid phosphatase	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Naphthol- AS-BI-phosphohydrolase	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Species (strains): 1, *V. breoganii* (seven strains) 2, *V. comitans*; 3, *V. inusitatus*; 4, *V. rarus*; 5, *V. ezuriae*; 6, *V. neonatus*; 7, *V. haliotocoli*; 8, *V. gallicus*; 9, *V. superstes*. +, positive; -, negative; V +, variable, type strain is positive (numbers of strains testing positive are in parenthesis); V -, variable, type strain is negative (numbers of strains testing positive are in parenthesis). All species are fermentative, sensitive to the Vibriostatic agent 0/129 (150µg), non motile, positive for oxidase, catalase, requirement of Na+ for growth, reduction of nitrate, growth at 3% NaCl and at 15-30°C, growth on TCBS, production of alginase and acid production from D-glucose and D-mannitol, and negative for pigmentation, swarming, growth above 37°C and under 0.5%, gas production from D-glucose, arginine dihydrolase, lysine and ornithine decarboxylase, luminescence, hydrolysis of agar, production of amylase, gelatinase and lipase, acid production of D-sorbitol, L-arabinose and inositol.

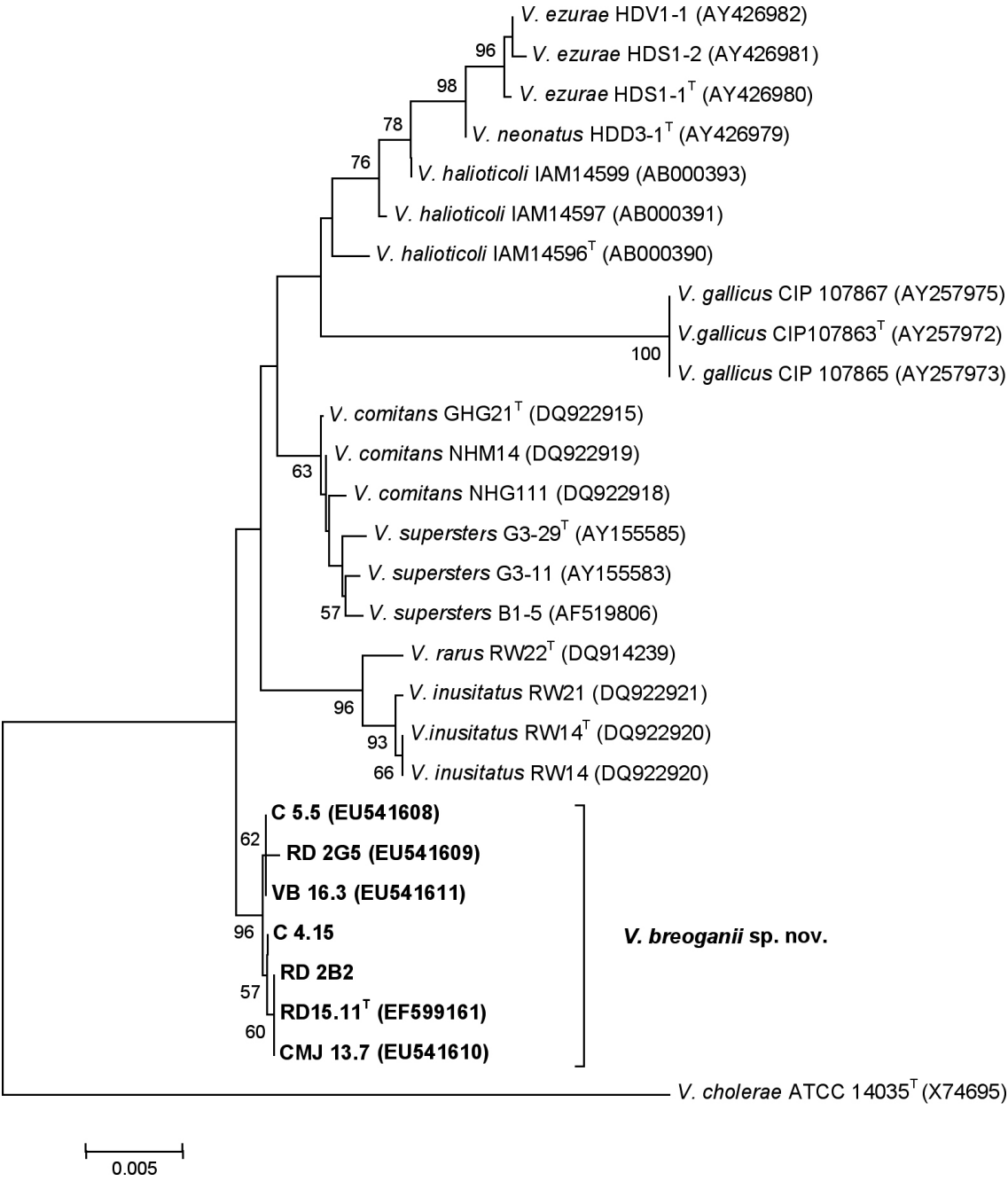
**Table 2.** Sequence similarity values between 16S rRNA, *recA*, *rpoA* and *atpA* gene sequences of *V. breoganii*, type strain RD 15.11<sup>T</sup> and related *Vibrio* species.

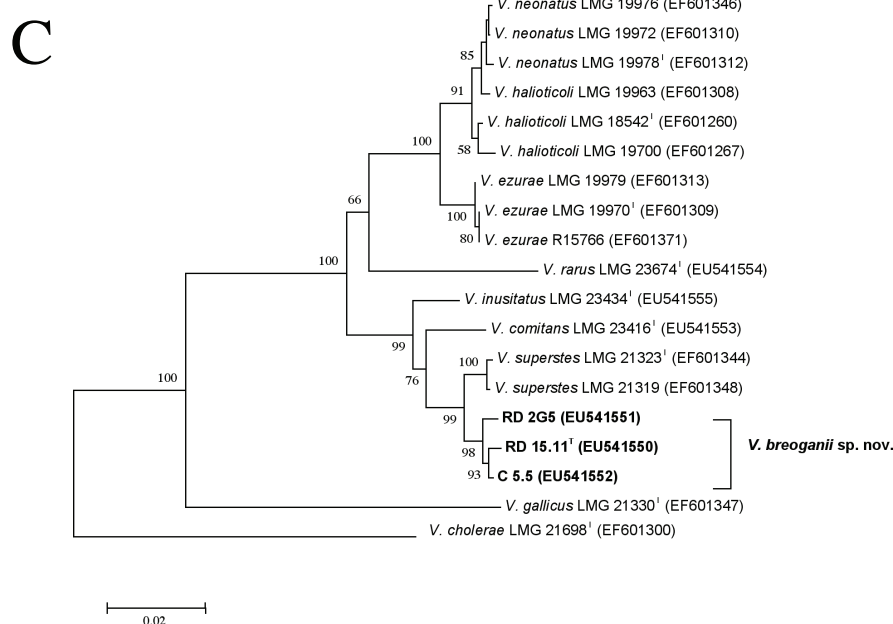
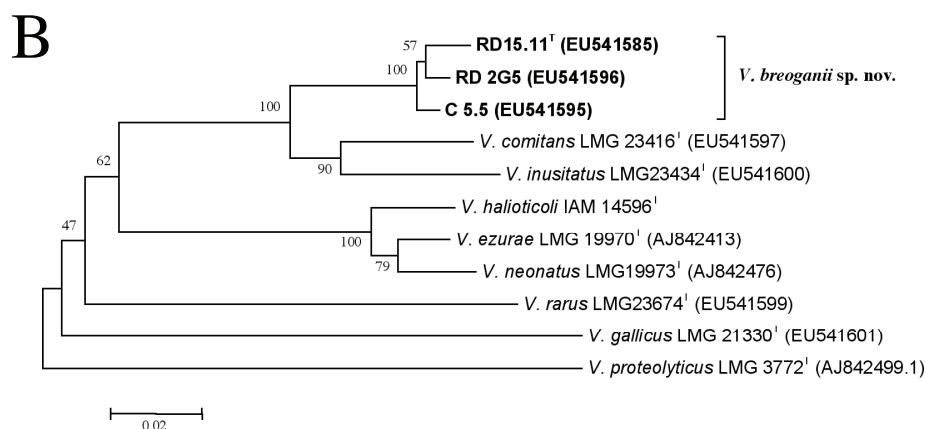
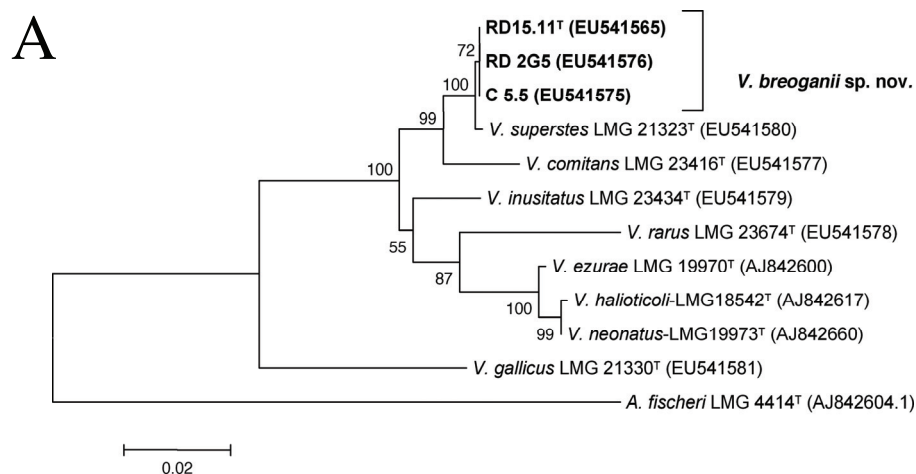
Type strains	16S	<i>recA</i>	<i>rpoA</i>	<i>atpA</i>
<i>V. comitans</i> LMG 23416 <sup>T</sup>	99.4	93.0	99.8	97.4
<i>V. inusitatus</i> LMG 23434 <sup>T</sup>	99.0	91.0	96.0	97.2
<i>V. rarus</i> LMG 23674 <sup>T</sup>	99.1	84.0	94.0	93.0
<i>V. superstes</i> DSM 16383 <sup>T</sup>	98.2	ND	99.8	98.4
<i>V. haliotocoli</i> IAM 14596 <sup>T</sup>	98.3	86.0	95.5	93.8
<i>V. ezurae</i> DSM 17533 <sup>T</sup>	97.6	86.6	95.7	94.4
<i>V. neonatus</i> DSM 17531 <sup>T</sup>	97.0	86.1	95.5	93.8
<i>V. gallicus</i> DSM 16639 <sup>T</sup>	97.5	82.0	92.0	88.5

## Figure Legends

**Fig.1.** Phylogenetic tree based on partial 16S rRNA gene sequences using the NJ algorithm. *Aliivibrio fischeri* was used as outgroup. The stability of the groupings was estimated by bootstrap percentages from 1000 replicates. Similar results were obtained employing the maximum parsimony algorithm.

**Fig. 2.** Phylogenetic trees based on partial *rpoA* (A), *recA* (B), and *atpA* (C) sequences obtained using the NJ algorithm. *Aliivibrio fischeri* or *Vibrio proteolyticus* were used as outgroup. The stability of the groupings was estimated by bootstrap percentages from 1000 replicates. Similar results were obtained employing the maximum parsimony algorithm.





***Vibrio gallaecicus* sp. nov. isolated from cultured clams in North Western Spain**

**Roxana Beaz Hidalgo<sup>1</sup>, Sabela Balboa<sup>1</sup>, Javier Pascual <sup>2</sup>, Alicia E. Toranzo<sup>1</sup>,  
Jesús L. Romalde<sup>\*1</sup>.**

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela. 15782, Santiago de Compostela. Spain.

<sup>2</sup> Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva. Universidad de Valencia. C/ Dr. Moliner 50, Burjassot, Valencia,

Submitted to: **Systematic and Applied Microbiology**. July 2008.

Running title: *Vibrio gallaecicus* sp. nov.

Section: New taxa, subsection Proteobacteria.

6908

\* Corresponding author:

Phone: +34-981563100 # 1

Fax: +34-981596904

E-mail: [jesus.romalde@usc.es](mailto:jesus.romalde@usc.es)

## **Abstract**

A group of three motile facultative anaerobic marine bacteria were isolated from cultured Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) in Galicia, North western Spain. The strains were characterized phenotypically and genotypically. Phylogenetic analysis on the 16S rRNA gene and four housekeeping genes (RNA polymerase alpha chain (*rpoA*), RecA protein (*recA*), the  $\alpha$ -subunit of bacterial ATP synthase (*atpA*) and the uridine monophosphate (UMP) kinase (*pyrH*) indicated that these strains are closely related to the *Vibrio splendidus* clade. AFLP fingerprints and phylogenies of the housekeeping and 16S rRNA gene sequences showed that the three strains represent a species different from all currently described vibrios. The new species could be differentiated from its nearest neighbours on the basis of several phenotypic features. The three strains are therefore a novel species within the genus *Vibrio*, for which the name *Vibrio gallaecicus* is proposed, with the type strain being VB 8.9<sup>T</sup> (=CECT 7244<sup>T</sup>= LMG 24045<sup>T</sup>).

**Keywords:** *Vibrio gallaecicus* sp. nov., *Vibrio splendidus* clade, MLSA, phylogeny.

### Introduction

*Vibrio splendidus* has been found to be a dominant vibrio species in coastal marine sediments, seawater and bivalves [2, 3, 11, 25]. In the past, it was considered an environmental organism, without any specific pathogenic significance. However several reports have proved that strains phylogenetically related with this species have been associated with mortalities of a wide range of marine animals such as molluscs [5, 6, 7, 10, 21, 28], fish [9, 20], shrimps [12] and octopus [3]. In bivalves, epidemiological studies of *V. splendidus* strains have been demonstrated its role as causative agent of mortalities in scallops (*Pecten maximus*), clams (*Ruditapes decussatus*) [7, 11] and oysters (*Crassostrea gigas*, *C. virginica*) [5, 6, 10, 21, 28, 36].

Genotypic studies based on ribotyping, amplified fragment length polymorphism (AFLP), or PCR-restriction fragment length polymorphism have revealed a remarkably high genetic diversity within this group and suggested its polyphyletic nature [14, 17, 29, 35]. Currently, eight species including *Vibrio lentus*, *V. tasmaniensis*, *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. chagasii*, *V. cyclitrophicus*, *V. gigantis* and *V. crassostreae* have been described within the group [4, 8, 15, 18, 30, 31], however the current range of biochemical tests is not sufficient to discriminate between these species. For bacterial identification DNA based methods are incorporated and molecular techniques are now widely recognized and recommended for species definition [26, 27, 29]. It has been demonstrated that sequences of the gene 16S rRNA for these species are highly similar not being useful for species differentiation [4, 8, 18, 28, 29]. The MLSA technique has been considered more appropriate to study the biodiversity of vibrios [32].

In a previous study a collection of *Vibrio* isolates were analysed by AFLP, one group with three strains could not be assigned to any of the currently known *Vibrio* species [1]. In this study we report on the taxonomic characterization of the AFLP cluster 48 consisting of three isolates originated from clam, *Ruditapes philippinarum* cultivated in Galicia. We propose that these isolates represent a new *Vibrio* species, for which we propose the name *Vibrio gallaecicus* sp. nov.



## **Materials and methods**

### **Bacterial strains and phenotypic tests.**

Three *Vibrio* strains VB 8.9<sup>T</sup> (= CECT 7224<sup>T</sup> = LMG 24045<sup>T</sup>), VB 5.12 and C 8.10 were isolated from cultured Manila clams, *Ruditapes philippinarum* during a two year survey (2004-2005) in north western coast of Spain [1]. Other reference strains used in this study were obtained from National Collections: *V. gigantis* DSM 18531<sup>T</sup>, *V. splendidus II* CECT 528<sup>T</sup>, *V. splendidus I* LMG 19031<sup>T</sup>, *V. crassostreae* LMG 22240<sup>T</sup>, *V. pomeroyi* LMG 20537<sup>T</sup>, *V. tasmaniensis* LMG 21574<sup>T</sup>, *V. lentus* CECT 5110<sup>T</sup>, *V. kanaloae* DSM 17181<sup>T</sup>, *V. chagasii* DSM 17138<sup>T</sup> and *V. cyclotrophicus*, LMG 21359<sup>T</sup>. All strains were cultured on plates of Marine agar (MA, Pronadisa) at 24-25°C. Stock cultures were maintained frozen at -80°C in Marine Broth (Oxoid) supplemented with 15% glycerol (v/v).

The main phenotypic characteristics of the marine strains isolated were determined as described previously [13, 19, 24, 37]. The following phenotypic tests were performed: Gram, oxidase, cell morphology and motility, oxidation/fermentation test, fermentation and acid production from inositol, manitol and sucrose, gas and acid production from glucose, indol, methyl red, Voges-Proskauer, utilization of citrate, alkalization / decarboxylation of arginine, lysine and ornithine, nitrates, hydrolysis of gelatinase, lipase, amylase, esculin and alginase, DNase and urease activities, salt tolerance tests (0, 0.5, 3, 6 and 8% of NaCl), growth at different temperatures (4°C, 37°C and 44°C) and growth on thiosulfate-citrate-bile salts sucrose (TCBS) agar (Oxoid). Sensitivity to the vibriostatic agent O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine) (150 µg per disc) and ampicillin (10 µg per disc) was determined in Müller-Hinton (Oxoid) agar. All media were supplemented with 1% NaCl when required. Additional phenotypic characteristics were performed using API 20E and API ZYM (BioMerieux, France) using saline solution (0.85%) for the bacterial suspension. The study of the acid production of 50 carbon sources was tested with the API 50CH with slight modifications. Briefly bacterial suspensions were prepared in saline solution, adjusted to an optical density of 1,0 at 580 nm and mixed (1:90, v/v) with the ZOF medium [13] for inoculation procedures [23].

### **Electron microscopy.**

Flagellar arrangement and cellular size were determined by transmission electron microscopy (TEM). For transmission electron microscopy cells were stained with fosfotungstic acid (2%) and processed samples were visualized by an electron microscope Philips CM-12.

### **16S rRNA and housekeeping genes analyses.**

Genomic DNA extraction, PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene was done as described previously [22]. Gene amplification of the genes *rpoA*, *recA*, *atpA* and *pyrH* were carried out as the methods described by Thompson *et al.* [32, 33, 34]. For the sequencing reactions the kit GenomeLab DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter) was used. The gene 16S rRNA and the four housekeeping genes were sequenced for the three strains. Sequencing of the housekeeping genes was also performed for the following type strains due to their absence in the GenBank/EMBL data base: genes *recA*, *rpoA* and *atpA* for the strains *V. gigantis* DSM 18531<sup>T</sup> and *V. crassostreae* LMG 22240<sup>T</sup>, *atpA* for *V. lentus* CECT 5110<sup>T</sup> and *pyrH* for the strains *V. gigantis* DSM 18531<sup>T</sup>, *V. splendidus* LMG 19031<sup>T</sup>, *V. crassostreae* LMG 22240<sup>T</sup>, *V. pomeroyi* LMG 20537<sup>T</sup>, *V. tasmaniensis* LMG 21574<sup>T</sup>, *V. lentus* CECT 5110<sup>T</sup> and *V. cyclotrophicus*, LMG 21359<sup>T</sup>. Sequence corrections and analysis were performed with DNASTAR Seqman program (Lasergene, USA). Sequences of close phylogenetic species were obtained by previous phylogenetic analyses on the entire database and BLAST searches against the latest EBI release. For the alignment of gene sequences, construction of the phylogenetic trees by neighbour joining and maximum parsimony and stability of clusters (Bootstrap analysis with 1000 replicates) were performed with the software package Mega version 4.0.

### **Results and discussion**

Cells of *V. gallaecicus* were large regular rods of variable size: 1.45-1.82  $\mu\text{m}$  long and 0.76-0.91  $\mu\text{m}$  wide. Presence of a polar flagellum was observed by TEM (Fig 1). The three marine isolates share the properties of the genus *Vibrio*. They are motile, facultative anaerobic, Gram-negative and oxidase positive, are susceptible to the vibriostatic agent O/129 (150  $\mu\text{g}$  per disc), and reduce nitrates to nitrites. *Vibrio gallaecicus* strains were phenotypically homogeneous with the exception of the use of D- saccharose, amygdalin and gentiobiose, positive only for the strain VB 5.12. Several differentiating phenotypic characteristics were found between *V. gallaecicus* sp. nov. and closely related *Vibrio* species (Table 1). Clear differences were obtained for the API ZYM tests trypsin, acid phosphatase and Naphthol-AS-BI- phosphohydrolase, negative only for *V. gallaecicus* strains in comparison with other *V. splendidus*- like type strains tested.

The results of our phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene clearly showed that the new strains belong to the 3 subgroup of the  $\gamma$  - *Proteobacteria*. The closest phylogenetic neighbours of the three clam strains belonged to the *V. splendidus* group (Fig. 2) but no single known species could be grouped significantly with *V. gallaecicus* in a robust clade. The three strains had 99.9% 16S rRNA gene sequence similarity to each other. The 16S rRNA gene sequence similarities ranged between 97.6% (VB 8.9<sup>T</sup> and *V. splendidus* ATCC 33125<sup>T</sup>) and 96.0% (VB 8.9<sup>T</sup> and *V. chagasii* LMG 13237). All percentages of the 16S rRNA gene sequence similarity presented in this taxonomic study are below the limit of intraspecies variability (98.7%) proposed by Stackebrandt & Ebbers [27] and allows discrimination of close vibrios from the *V. splendidus* clade and our strains at the species level. Clustering of *V. gallaecicus* strains was observed in phylogenetic trees based on four housekeeping genes (Fig. 3 a, b, c and d). For the genes *rpoA*, *recA*, *atpA* and *pyrH* sequence similarity between the *V. gallaecicus* strains were 99.6%, 99.2%, 99.5% and 99.6% respectively. Percentage similarities between the type strain and closely related vibrios are shown on Table 2. The phylogenetic tree based on concatenated sequences of the 16S rRNA gene and 3 housekeeping genes (*rpoA*, *recA* and *atpA*) confirmed the clustering of *V. gallaecicus* sp. nov. strains with a

bootstrap value of 100%, and their distinction from closest phylogenetic the neighbours (Fig. 4).

In conclusion our polyphasic study demonstrated clearly that the three clam isolates represent an undescribed species of the genus *Vibrio*. The name *Vibrio gallaecicus* sp. nov. is proposed with VB 8.9<sup>T</sup> as the type strain.

**Description of *Vibrio gallaecius* sp nov.**

*Vibrio gallaecius* [ga'.llaeci.cus. L. masc. adj. gallaecicus from Gallaecia (Galicia), the north-west region of Spain].

Cells are Gram-negative rods, motile and facultative anaerobic. Colonies are round with smooth margins, beige in color and non-swarming on MA plates. Strains grow on thiosulfate-citrate-bile salts sucrose (TCBS) agar. Strain VB 5.12 grows forming 1-1.5 mm yellow colonies where as strains VB 8.9 and C 8.10 produce 1-1.2 mm green colonies after 24 hours incubation. Glucose metabolism is fermentative without gas production. Strains reduce nitrates to nitrites. Oxidase and catalase tests are positive. Strains are sensitive to the vibriostatic agent O/129 (150µg per disc) and resistant to ampicillin (10µg per disc). All strains grow at 4°C and require NaCl for growth. The optimal NaCl concentration for growth is 1 to 3 % (wt/vol) and strains do not grow above 6 % NaCl concentrations. Not luminescent. All strains are negative for arginine dihydrolase and lysine and ornithine decarboxylases, ONPG, Voges-Proskauer, use of citrate and hydrolysis of urea. Indol and methyl red are positive. All strains hydrolyse starch, gelatin and Tween 80 but not alginate. All strains are positive for DNase and esculin activities. Acid is produced from: glycerol, D-ribose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, D-mannitol, N-acetyl-glucosamine, D-cellobiose, D-maltose, D-trehalose, glycogen, potassium gluconate and potassium 2-ketogluconate. None of the strains produce acid from erythritol, D-arabinose, L-arabinose, D-xilose, L- xilose, D-adonitol, methyl-βD-xylopranoside, D-galactose, L-sorbose, L-rhamnose, dulcitol, inositol, D-sorbitol, methyl-αD-mannopyranoside, methyl-αD- glucopyranoside, arbutine, salicine, D-lactose (bovine origin), D-melibiose, inulin, D-melezitose, D-rafinose, gentiobiose,

D-turanose, D-lixose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol and potassium 5-ketogluconate. API ZYM reaction tests were positive in all strains for alkaline phosphatase, butyrate esterase, esterase lipase and leucine arylamidase.

The type strain VB 8.9<sup>T</sup> (CECT 7224<sup>T</sup>, LMG 24045<sup>T</sup>) was isolated from clam *Ruditapes philippinarum* in north-western coast of Spain.

The GenBank accession numbers for the 16S rRNA gene sequences of *Vibrio gallaecicus* strains VB 8.9<sup>T</sup>, VB 5.12 and C 8.10 are EU541605, EU541613 and EU541612. The GenBank accession numbers for the *recA*, *rpoA*, *atpA* and *pyrH* gene sequences of strains VB 8.9<sup>T</sup> and C 8.10 are EU541587, EU541582, EU541566, EU871963, EU541582, EU541559, EU541560 and EU871964 respectively. The GenBank accession numbers for the *recA*, *rpoA* and *atpA* gene sequences of strains *Vibrio gigantis* DSM 18531<sup>T</sup> and *Vibrio crassostreae* LMG 22240<sup>T</sup> are EU541593, EU541594, EU541573, EU541574, EU541556 and EU541557 respectively. The GenBank accession number for the *atpA* gene sequence of strain *Vibrio lentus* CECT5110<sup>T</sup> is EU541558. The GenBank accession numbers for the *pyrH* gene sequences of strains *V. cyclitrophicus* LMG 21359<sup>T</sup>, *V. pomeroyi* LMG 20537<sup>T</sup>, *V. lentus* CECT 5110<sup>T</sup>, *V. gigantis* DAM 18531<sup>T</sup>, *V. crassostreae* LMG 22240<sup>T</sup>, *V. tasmaniensis* LMG 20012<sup>T</sup> and *V. splendidus* LMG 19031<sup>T</sup> are EU871958, EU871960, EU871958, EU871951, EU871948, EU871961 and EU871962.

### **Acknowledgements**

This work was supported in part by a grants AGL2003-09307-C02-01 and AGL2006-13208-C02-01, from the Ministerio de Ciencia y Tecnología and grant PGIDIT04PXIC20001PN from the Xunta de Galicia (Spain). R B. H. acknowledge the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain) for research fellowship.

### **References**

- [1] R. Beaz Hidalgo, I. Cleenwerck, S. Balboa, M. De Wachter, F. Thompson, J. Swings, P. De Vos, J. L. Romalde, Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates associated with clam culture in Galicia (NW of Spain). Syst. Appl. Microbiol. 31 (2008) 215-222.
- [2] Farto, R., Montes M., Perez, J., Nieto, T. P., Larsen, J. L. y Pedersen, K. Characterization by numerical taxonomy and ribotyping of *Vibrio splendidus* biovar I and *Vibrio scophthalmi* strains associated with turbot cultures. J. Appl. Microbiol. 86, (1999) 796-804.
- [3] Farto, R., Armada, S. P., Montes, M., Guisande, J. A., Pérez, M. J. y Nieto, T. P. (2003). *Vibrio lentus* associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*). J. Invert. Pathol. 83 (2003)149-156.
- [4] N. Faury, D.Saulnier, F. L. Thompson, M. Gay, J. Swings, F. Le Roux, *Vibrio crassostreae* sp. nov isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54 (2004) 2137-2140.
- [5] M. Garnier, Y. Labreuche, C. García, M. Robert, J. L. Nicolas, Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Microb. Ecol. 53 (2007) 187-196.
- [6] Gay, M., Renault, T., Pons, A. M. y Le Roux, F. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. Dis. Aquat. Org. 62 (2004) 65-74.
- [7] J. Gómez-León, L. Villamil, M. L. Lemos, B. Novoa, Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. Appl. Environ. Microbiol. 71 (2005) 98-104.
- [8] B. P. Hedlund, J. T. Staley, *Vibrio cyclotrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degrading marine bacterium. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51 (2001) 61-66.
- [9] Jensen, S., Samuelsen, O. B., Andersen, K., Torkildsen, L., Lambert, C., Choquet, G., Paillard, C. y Berg, O. Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *V. tapetis* isolated from corwing wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis. Dis. Aquat. Org. 53 (2003) 25-31.

- [10] A. Lacoste, S. Jalabert, S. Malham, A. Cueff, F. Gelebart, C. Cordevant, M. Lange, S. A. Poulet, A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). Dis. Aquat. Org. 46 (2001) 139-145.
- [11] Lambert C., Nicolas J.L., Cilia V. y Corre S. *Vibrio pectenica* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. Int. J. Syst. Bacteriol. 48 (1998) 481-487.
- [12] Leano, E. M., Lavilla- Pitogo, C. R. y Paner, M. G. Bacterial flora in the hepatopancreas of pond reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous vibriosis. Aquaculture 164 (1998) 367-374.
- [13] M. L. Lemos, A. E. Toranzo, J. L. Barja, Modified medium for the oxidation-fermentation test in the identification of marine bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 49 (1985) 1541-1543.
- [14] F. Le Roux, M. Gay, C. Lambert, M. Waechter, S. Poubalanne, B. Chollet, J. L. Nicolas, F. C. J. Berthe, Comparative analysis of *Vibrio splendidus*- related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. Aquat. Living Resour. 15 (2002) 251-258.
- [15] F. Le Roux, A. Goubet, F. L. Thompson, N. Faury, M. Gay, J. Swings, D. Saulnier, *Vibrio gigantis* sp. nov. Isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55 (2005) 2251-2255.
- [16] F. Le Roux, B. Austin, *Vibrio splendidus*, In: F. L. Thompson, B. Austin, J. Swings (Eds). The Biology of Vibrios, Washington: ASM Press edition , 2006, pp. 285-296.
- [17] M. C. Macián, E. Garay, F. Gonzalez- Candelas, M. J. Pujalte, R. Aznar, Ribotyping of vibrio populations associated with cultured oysters (*Ostrea edulis*). Sys. Appl. Microbiol. 23 (2000) 409-417.
- [18] M. C. Macián, W. Ludwig, R. Aznar, P. A. D Grimont, K. H. Scleifer, E. Garay, M. J. Pujalte, *Vibrio lentus* sp. nov., isolated from Mediterranean oysters. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51 (2001) 1449-1456.

- [19] J. F. Mac Faddin, Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. The William & Wilkins Company. Baltimore. (1993). Translation by Médica Panamericana S.A.
- [20] Montes, M., Faro, R., Pérez, M. J., Armada, S. y Nieto, T. P. Genotypic diversity of *Vibrio* isolates associated with turbot (*Scophthalmus maximus*) culture. Research. Microbiol. 157 (2006) 487-495.
- [21] J. L. Nicolas, S. Corre, G. Gauthier, R. Robert, D. Ansquer, Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. Dis. Aquat. Org. 27 (1996) 67-76.
- [22] S. Prado, J. L. Romalde, J. Montes, J. L. Barja, Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. Dis. Aquat. Org. 67 (2005) 209-215.
- [23] Prado, Microbiota asociada a criaderos de moluscos patogénesis y probiosis. PhD Thesis (2006).
- [24] J. L. Romalde, A. E. Toranzo, Evaluation of the API 20E system for the routine diagnosis of the enteric redmouth disease. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 11 (1991) 147-149.
- [25] Sobecky, P. A., Mincer, T. J., Chang, M. C. Toukdarian, A. y Helinski, D. R. Isolation of broad- host- range replicons from marine sediment bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 64 (1998) 2822-2830.
- [26] E. Stackbrandt, W. Frederiksen, G. M. Garrity, A. D Grimont, P. Kämpfer, M. C. J. Maiden, X. Nesme, R. Roselló- Mora, J. Swings, H. G. Trüper, L. Vauterin, A. Ward, W. B. Whitman, Report of the ad hoc comitee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52 (2002) 1043-1047.
- [27] E. Stackbrandt, J. Ebers. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. Microbiology today 33 (2006) 152-155.
- [28] G. Sugumar, T. Nakai, Y. Hirata, D. Matsubara, K. Muroga, *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. Dis. Aquat. Org. 33 (1998) 111-118.



- [29] F. L. Thompson, B. Hoste, K. Vandeneulebroecke, J. Swings Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different source determined by Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism. System. Appl. Microbiol. 24 (2001) 520-538.
- [30] F. L. Thompson, C. C. Thompson, J. Swings, *Vibrio tasmaniensis* sp. nov. isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Syst. Appl. Microbiol. 26 (2003a) 65-69.
- [31] F. L. Thompson, C. C. Thompson, Y. Li, B. Gomez- Gil, J. Vanderberghe, B. Hoste, J. Swings, *Vibrio kanaloae* sp. nov., *Vibrio pomeroyi* sp. nov. and *Vibrio chagasii* sp. nov., from sea water and marine animals. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53 (2003b) 753-759.
- [32] C.C. Thompson, F. L. Thompson, K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, P. Dawyndt, J. Swings Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family *Vibrionaceae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54 (2004) 919-929.
- [33] F. L. Thompson, D. Gevers, C. C. Thompson, P. Dawyndt, S. Naser, B. Hoste, C. B. Munn J. Swings, Phylogeny and molecular identification of *Vibrios* on the basis of Multilocus Sequence Analysis. Appl. Environ. Microb. 71 (2005) 5107-5115.
- [34] C.C. Thompson, F. L. Thompson, A. C. Vicente. J. Swings, Phylogenetic analysis of *vibrios* and related species by means of *atpA* gene sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57 (2007) 2480-2484.
- [35] H. Urakawa, K. Kita- Tsukamoto, K. Ohwada, 16S rDNA restriction fragment length polymorphism analysis of psychrotrophic *vibrios* from Japanese coastal water. Can. J. Microbiol. 45 (1999) 1001-1007.
- [36] M. Waechter, F. Le Roux, J. L. Nicolas, E. Marissal, F. Berthe, Characterization of pathogenic bacteria of the cupped oyster *Crassostrea gigas*. C. R. Biol. 325 (2002) 231-238.
- [37] P. A. West, P. R. Brayton, T. N Bryant, R. R. Colwell, Numerical taxonomy of *vibrios* isolated from aquatic environments. Int. J. Syst. Bacteriol. 36 (1986) 531-543.

**Table 1.** Phenotypic characteristics for distinguishing *V. gallaecicus* from phenotypically and phylogenetically related *Vibrio* species.

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ADH	-	+	-	+	V+	-	-	V+	+	-
ONPG*	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
Voges Proskauer	-	-	-	-	-	+	V+	-	-	ND
Acid from:										
D- sucrose*	V-(1)	-	-	+	+	-	-	+	-	+
D- manitol*	+	+	+	+	+	+	V-	-	-	+
D- melibiose*	-	-	V	+	V-	-	V-	-	-	-
Amygdalin*	V-(2)	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L-arabinose*	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Susceptibility to:										
O/129 (150µg)	+	+	+	+	+	+	-	V	+	+
Ampicilin*	-	-	-	+	-	+	+	V	-	+
Growth at:										
35°C	-	-	V	-	-	+	-	-	-	+
6%	-	V-	-	V+	+	V	+	+	+	+
8%	-	-	V	-	+	-	-	V	V	+
Hydrolysis of:										
Gelatin	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Alginate*	-	V+	-	-	+	-	V-	-	-	-
Tween 80*	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
API ZYM										
Trypsin*	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid phosphatase*	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Naphthol-AS-BI- phosphohydrolase*	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-

+, positive; -, negative; V +, variable but type strain is positive (numbers of strains testing positive are in parenthesis); V -, variable but type strain is negative; \* testing performed in the laboratory on the type strain, ND, no data available. All taxa are negative for lysine and ornithine decarboxylase, acid from inositol, D-sorbitol and L-rhamnose. All taxa are positive for indol and hydrolysis of starch. Taxa are indicated as: 1, *V. gallaecicus* (3 strains); 2, *V. gigantis* DSM 18531<sup>T</sup>; 3, *V. splendidus II*, CECT 528<sup>T</sup>; 4, *V. crassostreae*, LMG 22240<sup>T</sup>; 5, *V. pomeroi*, LMG 20537<sup>T</sup>; 6, *V. tasmaniensis*, LMG 21574<sup>T</sup>; 7, *V. lentus* CECT 5110<sup>T</sup>; 8, *V. kanaloae* LMG 20539<sup>T</sup>; 9, *V. chagasii* LMG 21353<sup>T</sup>; 10, *V. cyclitrophicus*, LMG 21359<sup>T</sup>. Data from: [8, 15, 18, 30, 31].

**Table 2.** Sequence similarity values between 16S rRNA, *recA*, *rpoA*, *atpA* and *pyrH* gene sequences of *V. gallaecicus* type strain VB 8.9<sup>T</sup> and related *Vibrio* species.

Type strains	16S	<i>recA</i>	<i>rpoA</i>	<i>atpA</i>	<i>pyrH</i>
<i>V. splendidus</i> LMG 19031 <sup>T</sup>	97.6	86.5	97.8	97.2	92.0
<i>V. gigantis</i> DSM 18531 <sup>T</sup>	97.3	86.0	97.0	97.0	91.0
<i>V. pomeroi</i> LMG 20537 <sup>T</sup>	97.1	86.0	97.8	97.3	91.0
<i>V. crassostreae</i> LMG 22240 <sup>T</sup>	97.1	86.0	97.0	97.0	91.0
<i>V. lentus</i> CECT 5110 <sup>T</sup>	96.7	86.6	98.2	97.0	93.0
<i>V. tasmaniensis</i> LMG 21574 <sup>T</sup>	96.9 97.0	86.7 86.6	98.0 97.7	98.6 98.1	90.0 91.0
<i>V. cyclitrophicus</i> LMG 21359 <sup>T</sup>	96.0	87.6	97.7	93.6	90.0
<i>V. chagasii</i> DSM 17138 <sup>T</sup>	97.0	86.6	97.0	98.9	ND

### Figure legends

**Fig. 1.** Transmission electron micrograph of *Vibrio gallaecicus* sp. nov.

**Fig. 2.** Unrooted phylogenetic tree based on partial 16S rRNA gene sequences obtained by the Neighbour joining method. The *Vibrio cholerae* ATCC 14035<sup>T</sup> was used as an out-group. GeneBank sequence accession numbers are given in parentheses. Numbers at the nodes show the percentages bootstrap values. The bar represents 0.005 substitutions per nucleotide position.

**Fig. 3.** Unrooted phylogenetic tree based on partial gene sequences obtained by the Neighbour joining method. a) *rpoA*, b) *recA*, c) *atpA* and d) *pyrH* genes. The *Vibrio cholerae* ATCC 21698<sup>T</sup> and the *Aliivibrio fischeri* ATCC 7744<sup>T</sup> were used as out-groups. GeneBank sequence accession numbers are given in parentheses. Numbers at the nodes show the percentages bootstrap values. The bar represents 0.01/0.02 substitutions per nucleotide position.

**Fig. 4.** Unrooted phylogenetic tree based on concatenated sequences of three genes *recA*, *rpoA*, *atpA* and the 16S rRNA gene. The *Vibrio cholerae* ATCC 14035<sup>T</sup> was used as the outgroup. Numbers at the nodes show the percentages bootstrap values. The bar represents 0.01 substitutions per nucleotide position.

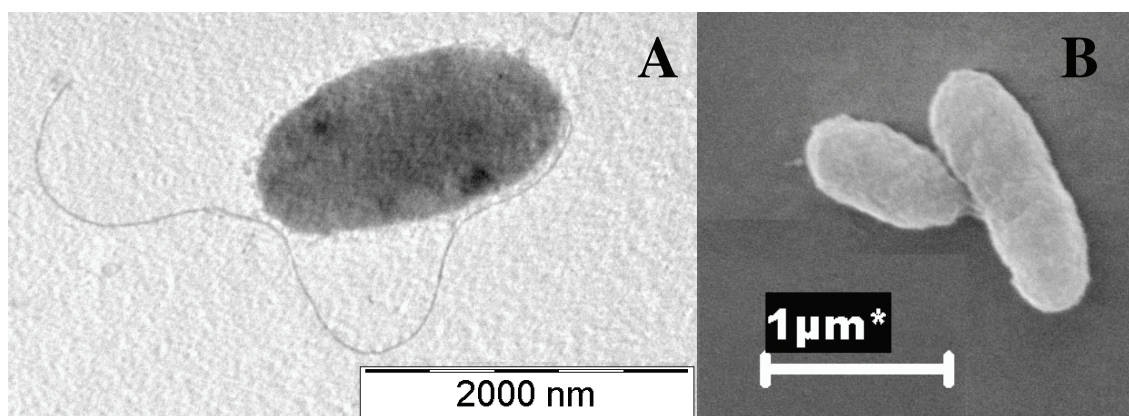


Fig. 1.- Beaz-Hidalgo et al.

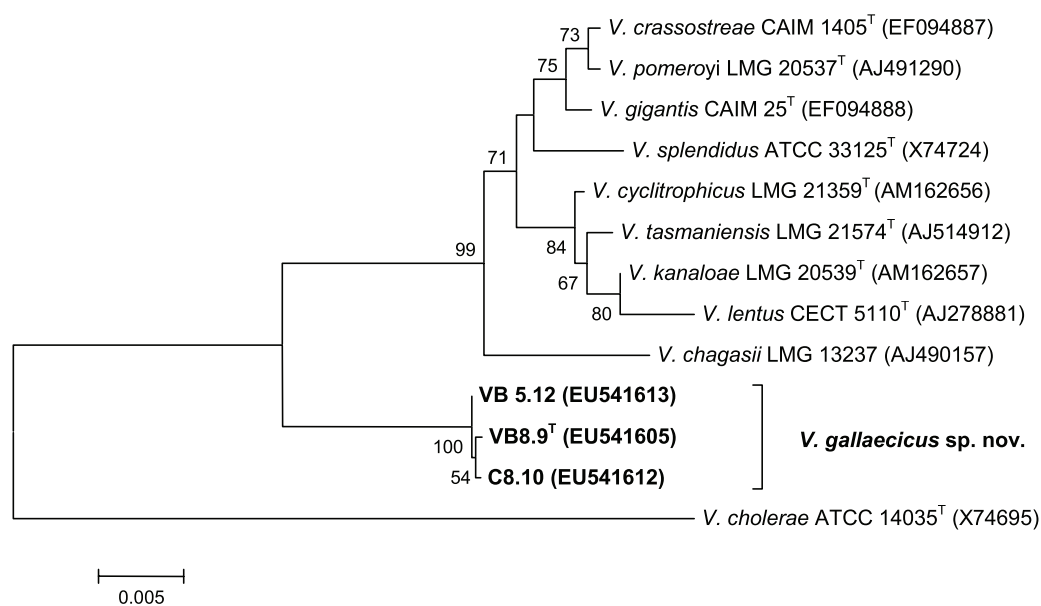


Fig. 2. Beaz-Hidalgo et al.

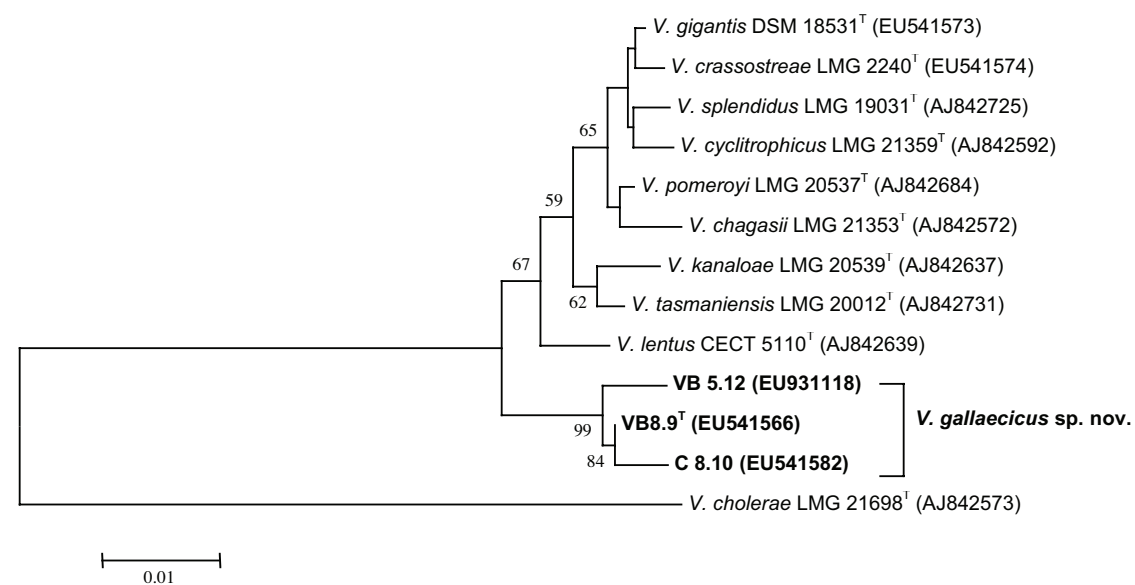


Fig. 3 (a) Beaz-Hidalgo et al.

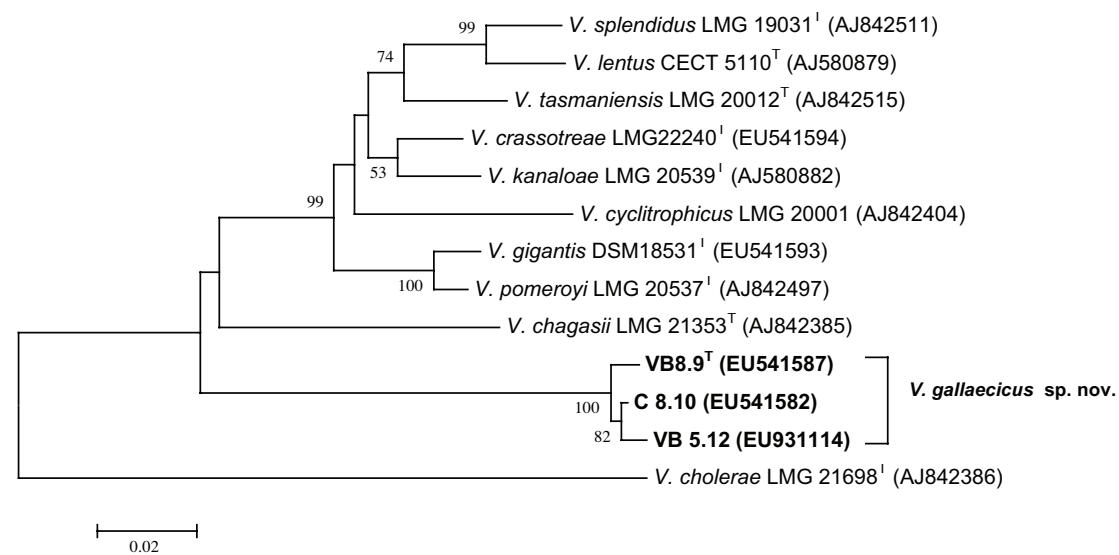


Fig.3. (b) Beaz-Hidalgo et al.

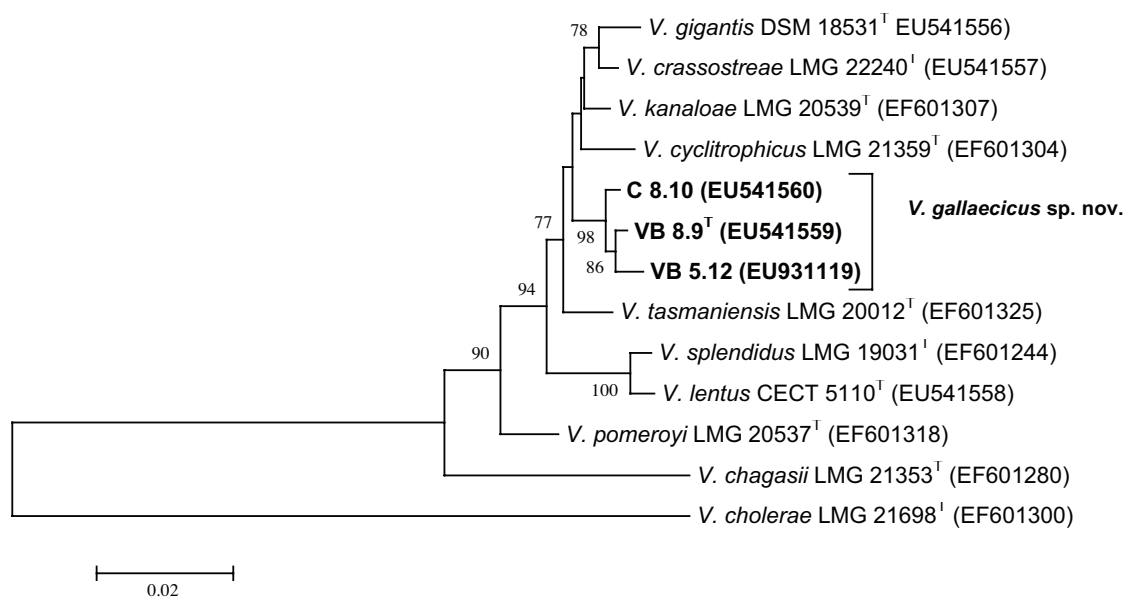


Fig.3. (c) Beaz-Hidalgo et al

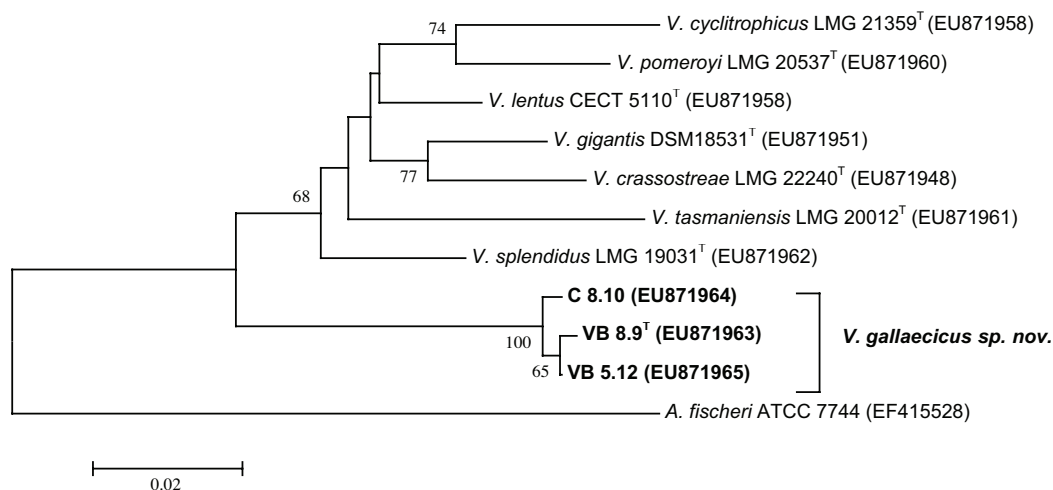


Fig.3. (d) Beaz-Hidalgo et. al.

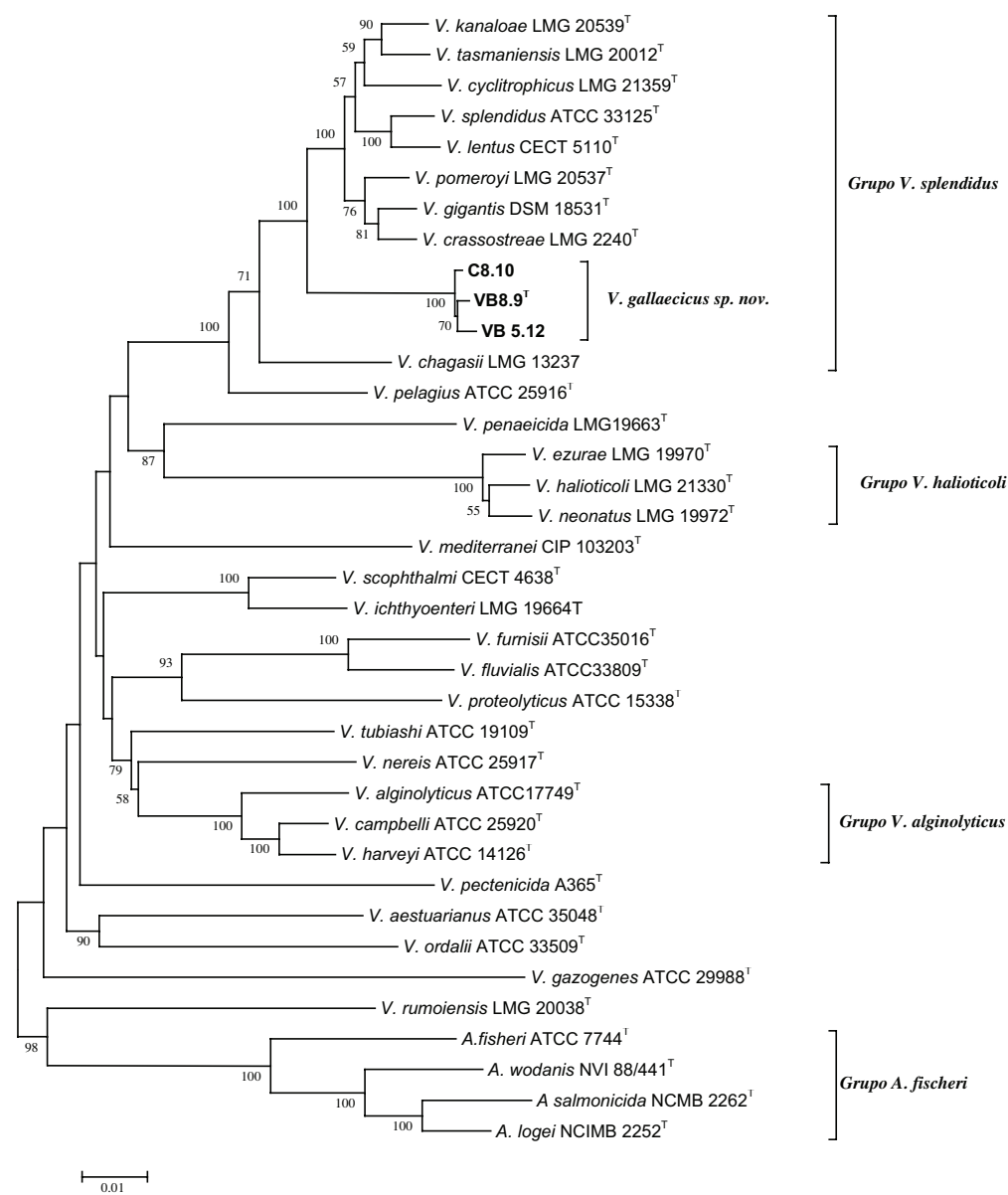


Fig.4. Beaz-Hidalgo et al.



*Aliivibrio finisterrae* sp. nov. isolated from Manila clams, *Ruditapes philippinarum*

**Roxana Beaz Hidalgo, Alejandra Doce, Juan L. Barja,**

**Jesús L. Romalde\*.**

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela. 15782, Santiago de Compostela. Spain.

Submitted to: **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.**  
July 2008.

Running title: *Aliivibrio finisterrae* sp. nov.

Section: New taxa, subsection Proteobacteria.

\* Corresponding author:

Phone: +34-981563100 # 16908

Fax: +34-981596904

E-mail: [jesus.romalde@usc.es](mailto:jesus.romalde@usc.es)

Four strains isolated from cultured Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, were characterized phenotypically and genotypically. Phylogenetic analyses based on the 16S rRNA gene sequences indicated that these bacteria were closely related to *Aliivibrio wodanis*, *A. salmonicida*, *A. fischeri* and *A. logei* with sequence similarities between 98.1% and 96.0%. Phylogenetic analysis based on the RNA polymerase alpha chain (*rpoA*), RecA protein (*recA*), the  $\alpha$ -subunit of bacterial ATP synthase (*atpA*) and the uridine monophosphate (UMP) kinase (*pyrH*) genes and fluorescent amplified fragment length polymorphism (AFLP) experiments clearly showed that these new isolates form a tight genomic group different from any currently known *Aliivibrio* species. The name *Aliivibrio finisterrae* sp. nov. (type strain CMJ 11.1<sup>T</sup>= CECT 7228<sup>T</sup> = LMG 23869<sup>T</sup>) is proposed to encompass the new taxon. Several phenotypic features were revealed that discriminate *A. finisterrae* from other *Aliivibrio* species.

The type strain CMJ 11.1<sup>T</sup> (=CECT 7228<sup>T</sup>, LMG 23869<sup>T</sup>) was isolated from clam *Ruditapes philippinarum* in north-western coast of Spain.

The 16S rRNA, *recA*, *rpoA*, *atpA* and *pyrH* gene sequences of *Aliivibrio finisterrae* strains CMJ 11.1<sup>T</sup> (=CECT 7228<sup>T</sup>=LMG 23869<sup>T</sup>), C 13.19 and C 17.13 are deposited in GenBank/EMBL under the accession numbers EU541604, EU541614, EU541616, EU541586, EU541583, EU541584, EU541567, EU541583, EU541584, EU541561, EU541562, EU541563, EU889126, EU889127 and EU889129 respectively. The 16S rRNA gene sequence of the *Aliivibrio finisterrae* strain VB 14.7 and the *atpA* gene sequence of *Aliivibrio salmonicida* NCIMB 2262<sup>T</sup> are deposited in GenBank/EMBL under the accession numbers EU541615 and EU541564, respectively.

Disagreement and ambiguity of the taxonomy and phylogenetic placement of the *Vibrio fischeri* group between the genus *Vibrio* and *Photobacterium* originates in the 1970s and has remained uncertain until today (Reichelt & Baumann, 1973, Baumann & Baumann, 1977, Baumann *et al.* 1980, Thyssen & Ollevier, 2005). A recent study by Urbanczyk *et al.* (2007) demonstrated the phylogenetical and phenotypical distinction of the group from other genera in the Family *Vibrionaceae* and proposed the new genus *Aliivibrio*. The genus *Aliivibrio* contains four species: *Aliivibrio fischeri* and three extremophilic species, *A. salmonicida*, *A. wodanis* and *A. logei*. *Aliivibrio fischeri*, originally described as *Vibrio fischeri* by Beijerinck *et al.* (1889) (cited in Urbanczyk *et al.* 2007), is known for the light organ symbiosis with the Hawaiian bobtail squid *Euprymna scolopes* and has been studied as a model for vibrio-host interactions. Bacterial bioluminescence acts as an antipredatory mechanism and serves researches as a way to monitor bacterial colonization (Stabb *et al.* 2006). *Aliivibrio salmonicida* described by Egidius *et al.* (1986), is a psychrophilic species and has been known as the causative agent of cold water vibriosis (Colquhoun & Sorum 2001) or the Hitra disease affecting Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Egidus *et al.* 1981). *Aliivibrio wodanis* (Lunder *et al.* 2000) also affects Atlantic salmon and has been associated with the winter ulcer disease (Lunder *et al.* 1995). *Aliivibrio logei* shares characteristics with the other members of the genus. The bacteria is bioluminescent, has the ability to associate with salmonids reared at low temperatures and causes the Hitra disease (Benediktsdottir *et al.* 1998) but also resides symbiotically in light organs of several species of Mediterranean sepiolid squids. At low temperatures (15°C) is the dominant symbiont, where as at higher temperatures (26°C) it is out competed by *A. fischeri* (Fidopiastis *et al.* 1998, Nishiguchi, 2000).

*Aliivibrio*-related species and their hosts have been considered either as a co-evolution symbiosis or as a pathogenic disease. To understand the driving force of the genetic diversity and speciation of *A. fischeri* related species is important to isolate novel species within this genus. In this study we isolated four strains from cultured Manila

clams, *Ruditapes philipinarum*. Phylogenetic analysis and phenotypic characterization demonstrated that these strains represent an unknown species of the genus *Aliivibrio*.

During a sampling program performed in the years 2004 and 2005, a collection of marine bacterial strains were isolated from different geographical sites on the north-western coast of Spain. In a previous study, a representative number of isolates of this collection were analyzed by AFLP and one of the clusters with 4 strains (CMJ 11.1<sup>T</sup> [= CECT 7228<sup>T</sup> = LMG 23869<sup>T</sup>], VB 14.7, C 13.19, C 17.13) could not be assigned to any of the currently known *Vibrionaceae* species (Beaz-Hidalgo *et al.* 2008). All strains were cultured on plates of Marine Agar (MA, Pronadisa) and were grown at 25 ±1 °C for 24h. The strain *A. salmonicida* NCIMB 2262<sup>T</sup> was also used in this study and was grown at 15°C for 24h. Stock cultures were maintained frozen at -80°C in Marine Broth (Pronadisa) supplemented with 15% glycerol (v/v). Biochemical characterization of the four marine isolates was performed by standard techniques, following the methodologies described by Lemos *et al.* (1985), McFaddin (1993), West *et al.* (1986) and Romalde & Toranzo (1991). Further phenotypic characterization was performed using API 20E and API ZYM (BioMerieux, France) following the instructions of the manufacturer, with the exception of using saline solution (0.85%) for the preparation of the inocule. The study of the acid production of 50 carbon sources was tested with the API 50CH with slight modifications. Briefly bacterial suspensions were prepared in saline solution, adjusted to an optical density of 1,0 at 580 nm and mixed (1:90, v/v) with the ZOF medium (Lemos *et al.* 1985) for inoculation procedures (Prado *et al.* 2006).

Flagellar arrangement and cellular size were determined by transmission electron microscopy (TEM). For transmission electron microscopy cells were stained with fosfotungstic acid (2%) and processed samples were visualized by an electron microscope Philips CM-12.

Genomic DNA extraction, amplification and sequencing reactions of the 16S rRNA gene were performed as previously described (Prado *et al.* 2005). Sequencing of the

genes *rpoA*, *recA*, *atpA* and *pyrH* were carried out by the methods described by Thompson *et al.* (2004, 2005, 2007). Sequencing reactions were performed using the kit GenomeLab DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter, USA). The gene 16S rRNA and four housekeeping genes were sequenced for all four strains. Sequencing was also performed for the strain *V. salmonicida* NCMB 2262<sup>T</sup> for the gene *atpA* due to its absence in the data base. Sequence corrections and analysis were performed with DNASTAR Seqman program (Lasergene, USA). Sequences of close phylogenetic species were obtained by previous phylogenetic analyses on the entire database and BLAST searches against the latest EBI release. Tree topology was performed by neighbour-joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987), distance matrices were calculated using Kimura's two parameter correction and stability of groupings and bootstrap analysis (1000 replicates) with the program Mega version 4.0.

Cells of *A. finisterrae* were large rods of size 1.36-2.15 µm long wide and 0.80-1.05 µm and occurred singly, in pairs or as aggregates of many cells. The presence of a polar flagellum was observed by TEM (Figure 1).

All strains isolated were motile, facultative anaerobic, Gram-negative, oxidase positive rods and susceptible to the vibriostatic agent O/129 (150 µg per disc). They were able to grow only in media supplemented with NaCl and reduced nitrates to nitrites. *Aliivibrio finisterrae* strains were phenotypically homogeneous, with 15 variable traits (Table S1). Several useful differentiating features were disclosed which discriminate *A. finisterrae* from other related *Aliivibrio* species (Table 1). All *A. finisterrae* strains did not grow on media supplemented with 0.5% NaCl and were positive for Moeller's arginine dihydrolase (ADH) unlike the other 4 *Aliivibrio* species. The urea test was positive for three strains of the new species but negative for the other species in the genera.

The results of the phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene showed clearly that the strains belong to the gamma-3 subgroup of the phylum *Proteobacteria*. The phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences confirmed the clustering of *A. finisterrae* sp. nov. strains CMJ 11.1<sup>T</sup>, VB 14.7, C 13.19 and C 17.13, with a bootstrap

value of 100%, and their distinction from their closest phylogenetic neighbours (Fig. 2). Strains of *A. finisterrae* had high levels of 16S rRNA gene sequence similarity to each other above 99.9%. Gene sequence similarities of the type strain with close phylogenetic neighbours were 98.1% with *A. wodanis* (NVI 88/441<sup>T</sup>), 97.8% with *A. logei* (NCIMB 2252<sup>T</sup>), 97.1% with *A. fischeri* (ATCC 7744<sup>T</sup>) and 96.0% with *A. salmonicida* (NCMB 2262<sup>T</sup>).

A recent work performed by Stackebrandt & Ebers (2006) recommended that the old limit value of a 16S rDNA gene sequence similarity threshold of 97% (Stackebrandt & Goebel, 1994) should be replaced by a threshold range of 98.7%-99.8% as the point at which DNA-DNA hybridization experiments should be mandatory to allow discrimination at the species level of a novel isolate. All levels of the 16S rRNA gene sequence similarity presented in this taxonomic study are below this new limit of intraspecies variability, and would allow discrimination between closest *Aliivibrio* species and our strains at the species level.

The clustering of *A. finisterrae* sp. nov. was observed in phylogenetic trees based on the housekeeping genes (Fig. 3, 4, 5 and 6). Similarities between *rpoA* sequences ranged between 98.1% (CMJ 11.1<sup>T</sup> and *A. wodanis* NVI 88/441<sup>T</sup>) and 97.2% (CMJ 11.1<sup>T</sup> and *A. fischeri* ATCC 7744<sup>T</sup>). Similarities between *recA* sequences ranged between 89.0% (CMJ 11.1<sup>T</sup> and *A. fischeri* ATCC 7744<sup>T</sup>) and 81.0% (CMJ 11.1<sup>T</sup> and *A. salmonicida* NCMB 2262<sup>T</sup>). Similarities between *atpA* sequences ranged between 95.1% (CMJ 11.1<sup>T</sup> and *A. wodanis* NVI 88/441<sup>T</sup>) and 92.0% (CMJ 11.1<sup>T</sup> and *A. salmonicida* NCMB 2262<sup>T</sup>). Finally similarities between *pyrH* sequences ranged between 90.0% (CMJ 11.1<sup>T</sup> with *A. wodanis* ATCC BAA-104<sup>T</sup> and *A. salmonicida* NCMB 2262<sup>T</sup>) and 87% (CMJ 11.1<sup>T</sup> and *A. fischeri* ATCC 7744<sup>T</sup>).

A concatenated tree based on the 16S rRNA gene and the 3 housekeeping genes revealed a robust clade of *A. finisterrae* sp. nov. strains with 100% bootstrap value, not including any validly described species (Fig. S2). Genomic and phenotypic data

described in this study clearly demonstrate that the four isolates should be accommodated in a novel species in the genus *Aliivibrio* namely *Aliivibrio finisterrae*.

**Description of *Aliivibrio finisterrae* sp. nov.**

*Aliivibrio finisterrae* [fi. nis. te. rrae. finisterrae from the end of the world. Galicia was the western end of the ancient Roman world]

Cells are Gram-negative rods, motile and facultative anaerobic. Colonies are round with smooth margins, translucent and non-swarming on MA plates. Strains grow on TCBS agar producing colonies of size 1-1.5 mm after 24 h of incubation. One strain (C17.13) produces yellow colonies on TCBS, the other strains produced green colonies. Glucose metabolism is fermentative without gas production. Strains reduce nitrates to nitrites. Oxidase, catalase and ONPG tests are positive. Sensitive to the vibriostatic agent O/129 (150µg per disc) and resistant to ampicillin (10µg per disc), and are able to grow at 4°C but not at 0 or 8% NaCl (wt/vol). Optimal NaCl concentration for growth is 1 to 3% (wt/vol). Not luminescent. All strains are positive for arginine and lysine decarboxylase and methyl red test. Three strains are positive for the urea test. Tests for Indol, Voges-Proskauer and use of citrate are negative. All strains do not hydrolyse starch, gelatin or alginate. All strains are positive for DNase and esculin activities. Tween 80 test is positive for three of the four isolates. Acid is produced from the following compounds: glycerol, D-glucose, D-ribose, D-galactose, D-fructose, D-mannose, Nacetyl-glucosamine, arbutin, salicine, D-cellobiose, D-maltose, D-lactose (bovine origin), D-gentiobiose and potassium 2-ketogluconate. None of the strains produce acid from erythritol, D-arabinose, L-arabinose, D-xilose, L-xilose, D-adonitol, methyl-βD-xylopranoside, L-sorbose, L-rhamnose, dulcitol, inositol, D-mannitol, D-sorbitol, methyl-αD-mannopyranoside, methyl-αD-glucopyranoside, amygdalin, D-saccharose, D-trehalose, inulin, D-melezitose, D-rafinose, starch, glycogen, xilitol, D-turanose, D-lixose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol, potassium gluconate and potassium 5-ketogluconate. API ZYM reaction tests were positive in all strains for alkaline phosphatase, butyrate esterase, esterase lipase and leucine arylamidase. The type strain is also positive for N-acetyl-β-glucosaminidase.

### **Acknowledgements**

This work was supported in part by a grants AGL2003-09307-C02-01 and AGL2006-13208-C02-01, from the Ministerio de Ciencia y Tecnología and grant PGIDIT04PXIC20001PN from the Xunta de Galicia (Spain). R B. H. acknowledge the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain) for research fellowship.

### **REFERENCES**

- Baumann, S. S. & Baumann, P. (1977).** Biology of the marine enterobacteria: genera *Beneckeia* and *Photobacterium*. *Annu Rev Microbiol* **31**, 39-61.
- Baumann, P., Baumann, L., Bang, S. S. & Woolkalis, M. J. (1980).** Reevaluation of the Taxonomy of *Vibrio*, *Beneckeia*, and *Photobacterium*: Abolition of the Genus *Beneckeia*. *Current Microbiol* **4**, 127-132.
- Beaz Hidalgo R., Cleenwerck I., Balboa S., De Wachter M., Thompson F. L., Swings J., De Vos, P. & Romalde J. L. (2008).** Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates associated with clam culture in Galicia (NW of Spain). *Syst Appl Microbiol* **31**, 215-222.
- Benediktsdottir, E., Helgason, S. & Sigurjonsdottir, H. (1998).** *Vibrio* spp. isolated from salmonids with shallow skin lesions and reared at low temperature. *J Fish Dis* **21**, 19-28.
- Colquhoun, D. J. & Sørum, H. (2001).** Temperature dependent siderophore production in *Vibrio salmonicida*. *Microb Pathog* **31**, 213-219.
- Egidius, E., Andersen, K., Causen, E. & Raa, J. (1981).** Cold water vibriosis or “Hitra disease” in Norwegian salmonid farming. *J Fish Dis* **4**, 353-354.
- Egidius, E., Wiik, R., Andersen, K., Hoff, K. A. & Hjeltne, B. (1986).** *Vibrio salmonicida* sp. nov., a new fish pathogen. *Int J Syst Bacteriol* **36**, 518-520.



- Fidopiastis, P. M., von Boletzky, S. & Ruby, E. G. (1998).** A new niche for *Vibrio logei*, the predominant light organ symbiont of squids in the genus *Sepiola*. *J Bacteriol* **180**, 59-64.
- Lemos, M. L., Toranzo, A. E. & Barja, J. L. (1985).** Modified medium for the oxidation-fermentation test in the identification of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* **49**, 1541-1543.
- Lunder, T., Evensen, Ø, Holstad, G. & Hastein, T. (1995).** “Winter ulcer” in the Atlantic salmon *Salmo salar*. Pathological and bacteriological investigations and transmission experiments. *Dis Aquat Org* **23**, 39-49.
- Lunder, T., Forum, H., Holstad, G., Steigerwalt, A. G., Mowinckel, P. & Brenner, D. J. (2000).** Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio viscosus* sp. nov. and *Vibrio wodanis* sp. nov. Isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with “winter ulcer”. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 427-450.
- Mac Faddin, J. F. (1993).** Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. The William & Wilkins Company. Baltimore. Translation by Médica Panamericana S.A.
- Nishiguchi, M. K. (2000).** Temperature affects species distribution in symbiotic populations of *Vibrio* spp. *Appl Environm Microbiol* **66**, 3550-3555.
- Prado, S., Romalde, J. L., Montes, J. & Barja J. L. (2005).** Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. *Dis Aquat Org* **67**, 209-215.
- Prado (2006).** Microbiota asociada a criaderos de moluscos patógenesis y probiosis. PhD Thesis.
- Reichelt, J. L. & Baumann, P. (1973).** Taxonomy of marine luminous bacteria. *Arch Microbiol* **94**, 283-330.
- Romalde, J. L. & Toranzo, A. E. (1991).** Evaluation of the API 20E system for the routine diagnosis of the enteric redmouth disease. *Bull Eur Ass Fish Pathol* **11**, 147-149.

- Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- Stabb, E. (2006).** The *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ Symbiosis. In *The Biology of Vibrios*, pp. 204-218. Edited by F. L. Thompson, B. Austin & J. Swings. Washington: ASM Press.
- Stackerbrandt, E. & Goebel, B. M. (1994).** Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 846-849.
- Stackerbrant, E., & Ebers, J. (2006).** Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology today* 152-155.
- Thyssen, A. & Ollevier, F. (2005).** Genus II. *Photobacterium* Beijerinck 1889, 401<sup>AL</sup>. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edn, vol. 2, part B, pp. 546-552. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer.
- Thompson C.C., Thompson F. L., Vandemeulebroecke, K., Hoste B., Dawyndt, P & Swings J. (2004).** Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family *Vibrionaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 919-929.
- Thompson, F. L., Gevers, D., Thompson, C. C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn C. B. & Swings, J. (2005).** Phylogeny and molecular identification of *Vibrios* on the basis of Multilocus Sequence Analysis. *Appl Environ Microb* **71**, 5107-5115.
- Thompson, C.C., Thompson, F. L., Vicente, A. C. & Swings, J. (2007).** Phylogenetic analysis of vibrios and related species by means of *atpA* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2480-2484.
- Urbanczyk, H., Ast, J. C., Higgins, M. J., Carson, J. & Dunlap, P. V. (2007).** Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Allivibrio logei* comb. nov., *Allivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2823-2829.
- West, P.A., Brayton, P.R., Bryant, T.N. & Colwell, R.R. (1986).** Numerical taxonomy of vibrios isolated from aquatic environments. *Int J Syst Bacteriol* **36**, 531-543.

**Table 1.** Phenotypic characteristics for distinguishing the novel species *A. finisterrae* from phylogenetically related *Aliivibrio* species.

Character	1	2	3	4	5
<u>Production of</u>					
Arginine dihidrolase	+	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	-	+	-
Indole	-	+	+	-	-
Urea	V+ (75)	-	-	V-	-
Voges- Proskauer	-	+	-	-	-
Methyl red Test	+	-	+	V+	-
<u>Degradation of:</u>					
Starch	-	-	+	-	-
Gelatin	-	-	+	-	-
Tween 80	V+ (75)	+	+	+	-
<u>Production of acid from:</u>					
Cellobiose	+	-	-	+	-
Glycerol	+	-	+	+	+
D- manitol	V- (25)	+	V-	V+	+
D- mannose	+	-	+	+	+
Salicin	+	+	-	V+	-
Sucrose	V- (25)	+	+	V-	-
Trehalose	V-(25)	-	+	+	+
<u>Growth in Na Cl:</u>					
0.5%	-	+	+	+	+
5%	V+ (75)	+	+	+	+
7%	-	+	V	-	-
<u>Growth at:</u>					
4°C	+	-	+	+	+
25°C	+	+	+	V-	-
<u>API ZYM tests:</u>					
Butyrate esterase	-	-	+	+	V+
Leucine arylamidase	+	+	+	+	-
Valine arylamidase	-	-	+	-	-
Trypsinase	V- (25)	-	-	-	-
Acid phosphatase	V- (25)	+	V	+	+
Naphthol phosphohydrolase	V- (25)	+	+	+	+

Taxa (species / strains) are indicated as: 1, *A. finisterrae* CMJ 11.1<sup>T</sup> (=CECT 7228 = LMG 23869) (4 strains) 2, *A. fischeri*, NCMB 1281<sup>T</sup>; 3, *A. wodanis* (35 strains); 4, *A. logei* (2 strains); 5, *A. salmonicida*. (2 strains). +, positive; -, negative; V +, variable but type strain is positive (percentage of strains testing positive are in parenthesis); V -, variable but type strain is negative (percentage of strains testing positive are in parenthesis). All strains were positive for catalase, oxidase, motility, growth at 15°C, growth in 3% NaCl, susceptibility to the vibriostatic agent and ampicillin, degradation of DNA, fermentation of D- glucose and acid production from alkaline phosphatase. All strains were negative for Gram stain, production of Ornithine decarboxylase, degradation of alginate, acid production from inositol, L-arabinose, melibiose, raffinose, L-rhamnose, D-sorbitol and D-xylose, production of cysteine arylamidase,  $\alpha$ -chymotrypsinase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -mannosidase and  $\alpha$ -fucosidase. Data from Lunder *et al.* (2000).

**Figure legends**

**Fig. 1.** Transmission electron micrograph of *Aliivibrio finisterrae* sp. nov.

**Fig. 2.** Phylogenetic tree based on partial 16S rRNA gene sequences. The *Vibrio splendidus* homologue was used as the outgroup. Horizontal branch lengths are proportional to evolutionary divergence. Bootstrap percentages from 1000 replicates appear next to the corresponding branch.

**Fig. 3.** Phylogenetic tree based on partial *rpoA* sequences. The *Vibrio splendidus* homologue was used as the outgroup. Other features as in Fig.1.

**Fig. 4.** Phylogenetic tree based on partial *recA* sequences. The *Vibrio splendidus* homologue was used as the outgroup. Other features as in Fig.1.

**Fig. 5.** Phylogenetic tree based on partial *atpA* sequences. The *Vibrio splendidus* homologue was used as the outgroup. Other features as in Fig.1.

**Fig. 6.** Phylogenetic tree based on partial *pyrH* sequences. The *Vibrio halioticoli* homologue was used as the outgroup. Other features as in Fig.1.

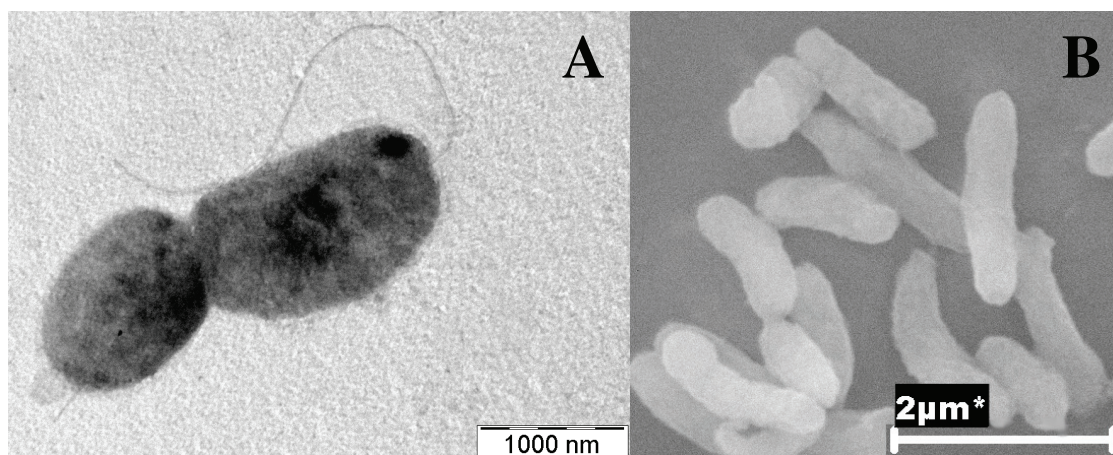


Fig. 1.- Beaz-Hidalgo et al.

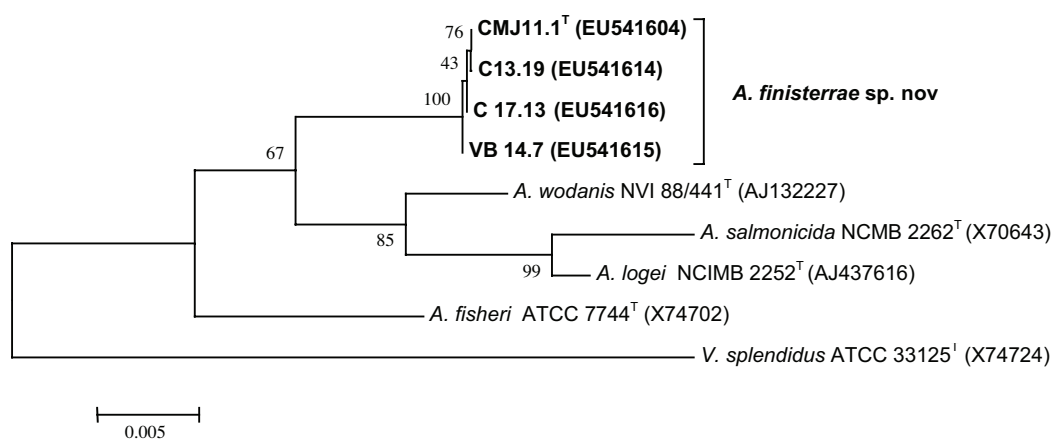


Fig. 2. Beaz-Hidalgo et al.

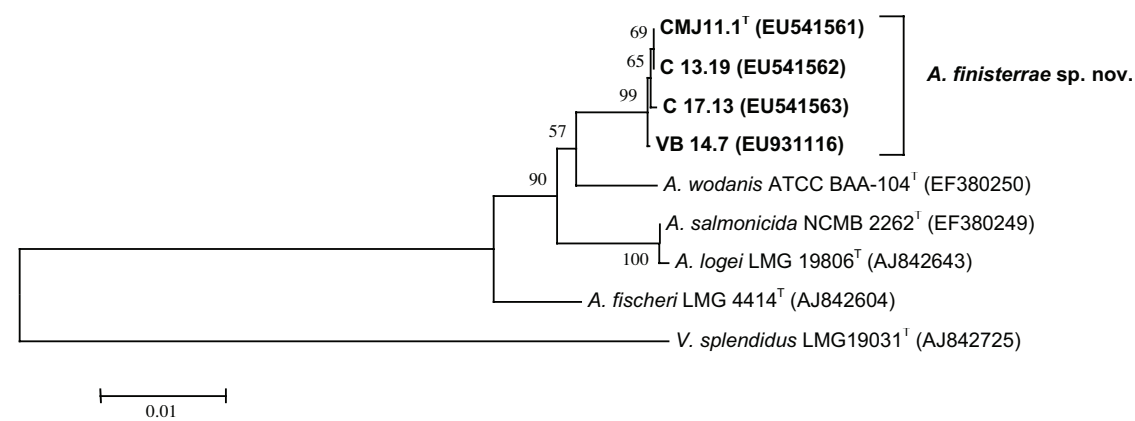


Fig. 3. Beaz-Hidalgo et al.

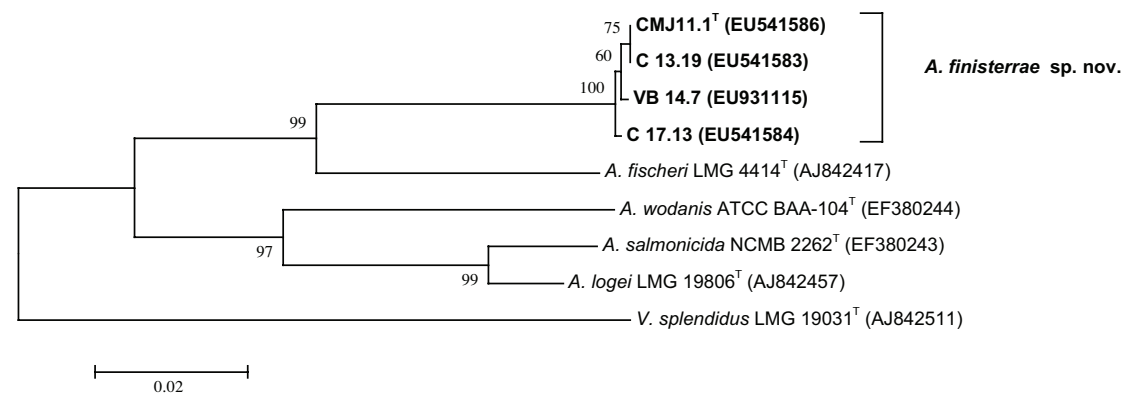
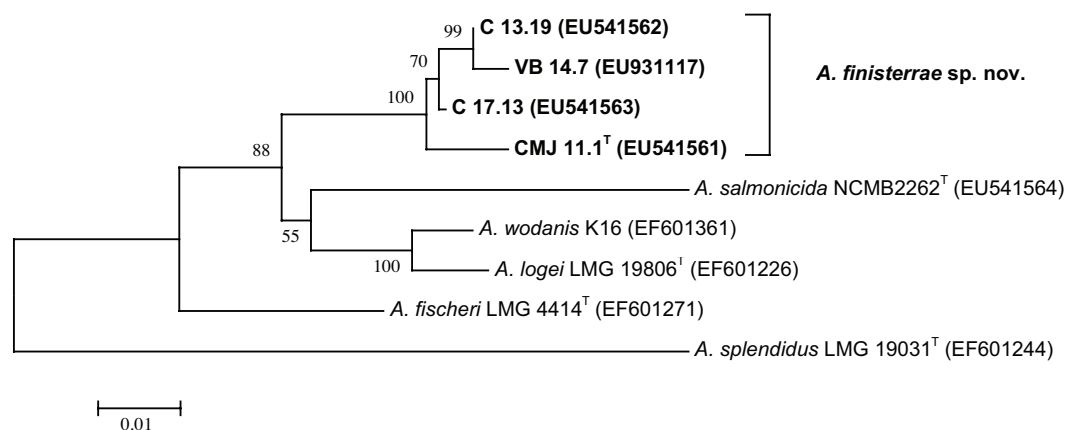
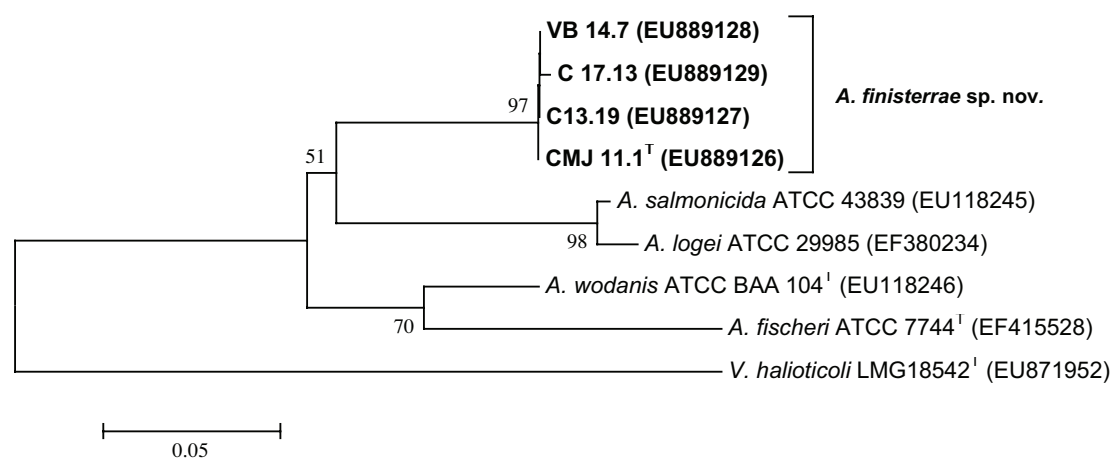


Fig. 4. Beaz-Hidalgo et al.



**Fig. 5.** Beaz-Hidalgo et al.



**Fig. 6.** Beaz-Hidalgo et al.





***Vibrio breoganii*, *V. gallaecicus* and *Aliivibrio finisterrae*: Electron microscopy, MALDI-TOF and ERIC, REP-PCR analysis.**

**Electron Microscopy.**

Visualization of bacterial cells was performed by transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM). Sample preparation for TEM was performed in saline solution (0.85%) in a 400 mesh copper slide covered with a layer of Formvar (SPI Supplies). Samples were stained with fosfotungstic acid (2%) and washed with miliQ water and processed samples were viewed using a Philips CM-12 transmission electron microscope.

For SEM, cells were grown to exponential phase, fixed with 1% gluteraldehyde and filtered through a 0.22µm filters (Anodisc). The filter was washed with a phosphate buffer solution (PBS) and exposed to dehydration changes in increasing concentrations of ethanol (30, 50, 70%), stained with uranyl acetate (2%) followed by 6 changes of ethanol 90% and 10 changes of absolute ethanol. The filter was washed in absolute ethanol and a drop added to SEM slide and viewed using a LEIC 440 scanning electron microscope (*LEICA Microsystems*, Cambridge, U. K.).

Cells of *V. breoganii* were short rods of variable size: 0.95-1.82 µm long and 0.58-0.65 µm wide. The presence of a capsule was detected by TEM but no bacterial flagellum was observed neither in transmission or scanning microscopy (Figure 5.4).

Cells of *V. gallaecicus* were large regular rods of variable size: 1.45-1.82 µm long and 0.76-0.91 µm wide. Presence of a polar flagellum was observed by TEM, but could not be distinguished by scanning microscopy as it was degraded in the processing of the samples (Figure 5.18).

Cells of *A. finisterrae* were large rods of size 1.36-2.15 µm long wide and 0.80-1.05 µm. The presence of a polar flagellum was observed only by TEM (Figure 5.32). Cells of all three species occurred singly, in pairs or as aggregates of many cells.

### **MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry).**

The MALDI-TOF-MS technique has recently been described as a useful method to identify Gram negative and Gram positive bacteria (van Baar 2000, Dickson et al. 2004, Dieckman et al. 2005). The main problem in the identification of microorganisms by MALDI-TOF-MS relies in the incomplete data bases with only a limited number of species available.

Unique protein profiles were obtained for the three type strains of the new species differentiating them from closely related species present in the data base (Figures 5.11, 5.25 and 5.39). The species-limit value considered was 2.300. As a positive control *Escherichia coli* was included in the analysis and a correct identification was obtained. Also as positive controls, protein profiles were compared with their own profiles and scores were always above 2.300. MALDI-TOF-MS defined closest species with respect to each of the three strains examined. For *V. breoganii* RD 15.11<sup>T</sup>, the closest species was *V. superstes* (score = 2.060), for *V. gallaecicus* VB 8.9<sup>T</sup>, was *V. gigantis* (score = 1.761) and for *A. finisterrae* CMJ 11.1<sup>T</sup>, was *A. fischeri* (score = 1.700).

Protein profiling based on MALDI-TOF-MS proved to be a useful, consistent and precise technology capable of differentiating the type strains analyzed from closely related species. The results obtained agreed with the molecular phylogenetic affiliations. Complete characterization of more bacterial species is necessary to bring this technique into full fruition as a viable bacterial identification tool.

#### **ERIC and REP-PCR.**

ERIC and REP-PCR analyses strain genomic diversity. In this study results obtained by ERIC and REP-PCR were coincident for the species *V. gallaecicus* and *A. finisterrae*, but not for *V. breoganii*.

For the 7 *V. breoganii* strains a total of 4 genetic profiles were obtained by REP-PCR with homologies higher than 90%, all profiles shared at least 80% homology (Figures 5.12 and 5.13). A total of 6 genetic profiles were differentiated using ERIC-PCR sharing less than 60% homology between them. ERIC-PCR resulted more discriminative than REP-PCR for an intraspecies differentiation (Figures 5.14 and 5.15).

For *V. gallaecicus* both REP and ERIC-PCR showed that the three strains presented different profiles, the type strain being the most divergent (Figures 5.26, 5.27, 5.28 and 5.29).

In the case of *A. finisterrae* the strain C 17.13 had a genetic profile different from the other 3 strains having similar ERIC and REP profiles (>75% homology) (Figures 5.39, 5.40, 5.41 and 5.42). The strain has already been described the most different phenotypically agreeing with the genetic profiles obtained by these repetitive DNA sequences.

The techniques of ERIC and REP-PCR have proved reproducible results and specificity for the differentiation between strains of the three new species described.

## **VI. VIBRIOS: ESTUDIO DE PATOGENICIDAD Y FACTORES DE VIRULENCIA**

## 6. VIBRIOS: DETERMINACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA E INFECCIONES *in vivo*.

### 6.1. INTRODUCCIÓN.

Como ya se ha comentado en el Capítulo 1 de esta Memoria, es frecuente la aparición de episodios de altas mortalidades en bivalvos producidos por patógenos bacterianos, siendo el género *Vibrio* uno de los principales problemas en el cultivo de la almeja, tanto en la fase larvaria como en la fase de engorde. Por tanto, los estudios de factores de virulencia e infecciones *in vivo* de nuevas especies asociadas al cultivo de bivalvos son importantes.

Las principales características que determinan la patogenicidad de las bacterias son su capacidad para fijarse y colonizar lugares específicos del hospedador, y la síntesis de sustancias que le causen daño, como pueden ser los productos extracelulares (ECP, “extracellular products”). Los ECP de especies del género *Vibrio* incluyen las enzimas extracelulares (gelatinasa, elastasa, lecitinasa, lipasa, etc), las citolisinas, citotoxinas, hemolisinas, hemoaglutininas y toxinas termoestables (Baffone y col. 2000). La virulencia de especies de *Vibrio* y su capacidad para inducir mortalidades en larvas y juveniles de bivalvos se han relacionado con la producción de estas toxinas extracelulares (Elston y col. 1980, Nottage y Birbeck 1987, Nottage y col. 1989, Riquelme y col. 1996, Lambert y col. 2001, Gómez-León y col. 2005).

La mayoría de los trabajos que han estudiado los ECP del género *Vibrio* se han relacionado principalmente con la virulencia en peces (Toranzo y Barja 1993). Uno de los principales patógenos responsable de la vibriosis en peces es *Vibrio (Listonella) anguillarum* (Toranzo y Barja 1990). Romalde y col. (1990) demostraron su alta toxicidad ya que causaba cambios degenerativos en tres líneas celulares con una baja concentración de proteína (20-25 µg/ml), en comparación con otras especies de *Vibrio* que requerían concentraciones más altas (80-100 µg/ml) para causar los mismos efectos. Santos y col. (1991) observaron diferencias en la susceptibilidad del rodaballo, trucha y

salmón a cepas de *V. anguillarum* de los serotipos O1 y O2; las diferencias no se asociaron con la toxicidad de los ECP sino con la capacidad de las cepas de *Vibrio* para invadir y colonizar las distintas células de peces. Wang y col. (1998) encontraron grandes diferencias entre especies de *Vibrio* y su efecto en líneas celulares de peces *in vitro*. Demostraron el potencial de adherencia e invasividad de cepas de *V. anguillarum* y de citotoxicidad de *P. damsela* subsp. *damsela*, así como la importancia de los microfilamentos de actina en la internalización de ambas especies.

Se ha demostrado también la patogenicidad para peces en otras especies de *Vibrio*. Biosca y Amaro (1996) estudiaron los ECP de los dos biotipos de *V. vulnificus*, y aunque ambos exhibieron altos potenciales citotóxicos e hidrolíticos, sólo el biotipo 2 mostró virulencia para anguilas.

Farto y col. (2002) purificaron una proteasa de los ECP de *Vibrio (Listonella) pelagius* y la asociaron con signos de vibriosis y efectos letales en rodaballo. En un estudio posterior detectaron una proteasa letal en los ECP de cepas del grupo *V. splendidus-V. lentus* mediante técnicas inmunológicas y enzimáticas (Farto y col. 2006). Wang y col. (2007) demostraron que cepas de *V. alginolyticus* poseen actividad hemolítica y producen una proteasa extracelular y sideróforos, que pueden estar relacionados con su virulencia. Otros estudios coinciden en que la producción de proteasas es un factor importante en la patogenicidad de *V. alginolyticus*, como los trabajos realizados en penaeidos (Kuo-Kau y col. 1997, Lee y col. 1997) y en ostra plana (Nottage y Birbeck 1987).

En moluscos bivalvos también se ha demostrado que la patogenicidad de especies de *Vibrio* está relacionada con su capacidad de producir ECP (Elston y Leibovitz 1980, Nottage y Birbeck 1986). Maeda y Yamamoto (1996) postularon que los ECP, que principalmente consisten en proteasas, facilitarían la propagación de la bacteria causando daños en los tejidos del hospedador y degradando sus proteínas para la obtención de nutrientes. Además, los ECP podrían alterar el sistema de defensa del

hospedador degradando las inmunoglobulinas y otros componentes.

Labreuche y col. (2006b) determinaron la toxicidad *in vivo* de los ECP de *V. aestuarianus* en ostras (*C. gigas*) juveniles, y evaluaron su respuesta inmune celular *in vitro*. Demostraron la inmunodeficiencia de las funciones de los hemocitos en presencia de los ECP de *V. aestuarianus*, reduciendo sus propiedades de adhesión y fagocitosis. Así, el patógeno bacteriano evita la actividad fagocítica, se multiplica en las ostras y les causa la muerte.

Gómez-León y col. (2005) realizaron inoculaciones *in vivo* de cepas de *V. splendidus* y *V. alginolyticus* en larvas de almeja (*R. decussatus*). Atribuyeron la mortalidad a las bacterias inoculadas, y demostraron que los ECP de ambas especies tienen actividad citotóxica que disminuye la supervivencia de los hemocitos de la almeja tras 24 horas de incubación. Sugirieron que los ECP de ambas especies intervienen en la patogénesis bacteriana y que las cepas de *V. alginolyticus* eran más virulentas por una mayor producción de sideróforos.

En un estudio posterior, Gómez-León y col. (2008) realizaron experimentos *in vivo* inoculando por baño dos cepas del género *Vibrio* y una cepa de *Roseovarius crassostreae* en todos los estadios de tres familias de ostra (*C. virginica*). Las tres cepas causaron mortalidades, que se incrementaron a temperaturas más altas y disminuyeron con el tamaño de las ostras. Sugirieron que las diferencias en la resistencia a la patogénesis bacteriana se debían a las barreras externas más sólidas adquiridas con el tamaño de los ejemplares. La toxicidad de los ECP para los hemocitos en las tres cepas fue similar en todos los estadios.

El objetivo de este Capítulo ha sido en primer lugar analizar algunos factores que puedan estar implicados en la virulencia y citotoxicidad de distintas especies de *Vibrio* y, en segundo lugar determinar el grado de virulencia del grupo de vibrios estudiados a

lo largo de esta Memoria, tanto en larvas como en almejas adultas.

## **6.2. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### ***6.2.1. Selección de cepas bacterianas.***

Las actividades enzimáticas y la citotoxicidad de los ECP se realizaron en 57 cepas de las 145 analizadas por AFLP en el Capítulo 4. Las cepas se han distribuido de la siguiente forma:

- a) Cepas no asignadas a ningún cluster (16).
- b) Cepas en clusters de AFLP: 28 cepas en 13 clusters.
- c) Nuevas especies descritas y posibles nuevas especies: 13 cepas en 4 clusters.

### ***6.2.2. Estudio de factores de virulencia extracelulares.***

#### ***6.2.2.1. Obtención de productos extracelulares.***

La obtención de los ECP a partir de medio sólido se realizó siguiendo la técnica de Liu (1957). Sobre placas de 24 x 24 cm (Nunc) que contenían el medio AM se depositaron membranas de celofán estériles, y se sembraron 3 ml de cultivos frescos de las distintas cepas mediante hisopos estériles. Se incubaron a  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 48 h, y las células bacterianas se recogieron lavando el celofán con PBS estéril. Las suspensiones se centrifugaron a 10.000 g durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , y los sobrenadantes se esterilizaron por filtración. Los extractos se distribuyeron en alícuotas de 2-3 ml y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### ***6.2.2.2. Caracterización de las actividades enzimáticas de los ECP in vitro.***

- a) Las actividades enzimáticas generales de los ECP se evaluaron mediante el sistema miniaturizado API-ZYM (bioMérieux). Las galerías se inocularon con 60  $\mu\text{l}$ /celdilla de cada ECP y se incubaron a  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. El revelado se realizó siguiendo las instrucciones del uso del fabricante.
- b) La actividad proteolítica presente en los ECP se determinó mediante un método colorimétrico, utilizando el sistema multiproteico Azocoll (Sigma), según las instrucciones de la casa comercial. A 100  $\mu\text{l}$  de cada muestra se añadieron 2,4 ml de una solución de Azocoll (8,4 mg/ml) en tampón Tris-HCl



(pH 7,2). La mezcla se incubó a 37°C en un baño durante 30 min. Para detener la reacción se añadieron 2,5 ml de una solución acuosa de ácido tricloroacético (10% p/v). La mezcla final se centrifugó 15 min a 2000 rpm y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 520 nm. Como blanco se utilizó el diluyente de la mezcla y se procesó de la misma forma. La unidad de actividad proteolítica equivale a una absorbancia de 1,0 a 520 nm.

c) Las actividades Tween 20, Tween 80, gelatinasa y amilasa se evaluaron por el método de difusión radial en placa utilizando como inóculo 10 µl de cada ECP, siguiendo la metodología clásica descrita en el apartado 3.2.2. del Capítulo 3.

d) La actividad de la caseinasa se evaluó de la misma forma en Agar Nutritivo suplementado con el 2% de caseína. Para la preparación del medio se mezclaron soluciones de leche descremada (4%) y de agar nutritivo (3%) esterilizadas por separado.

e) La actividad de la DNasa se determinó en placas de Agar DNA. Se reveló con HCl al 1%.

### 6.2.2.3. Cálculo de los niveles de proteínas.

El contenido de proteínas de los ECP se determinó según el método de Bradford (1976). Se realizó una recta patrón con concentraciones crecientes (5-100 µg/ml) de seroalbúmina bovina (Sigma). Se añadieron 5 ml del reactivo Bradford (Bio-Rad) por cada 100 µl de seroalbúmina, a las muestras y al control (agua destilada). Se homogeneizaron las muestras y se determinó la concentración por absorbancia a 595 nm. La concentración de proteínas se determinó por extrapolación en la recta patrón.

### 6.2.2.4. Citotoxicidad.

Para los ensayos de citotoxicidad se utilizó la línea celular de dorada SAF-1 (Béjar y col. 2005). La metodología empleada fue la descrita por Toranzo y col. (1983). Las células eucariotas se cultivaron en placas de 48 pocillos hasta conseguir monocapas confluentes. La temperatura de incubación fue 24±1°C. Antes de realizar el ensayo se

retiró el medio de los pocillos reemplazándolo por medio fresco (0,9 ml/pocillo). Las monocapas se incubaron con 0,1 ml de los ECP. Como controles negativos se utilizaron los medios PBS y CM sin inocular. Los pocillos se observaron periódicamente durante 72 h. Se consideró el efecto citotóxico por la aparición de acúmulos celulares, prolongaciones dendríticas, vacuolización, etc. La evaluación se determinó como destrucción parcial del tapiz celular (+), y destrucción total con desprendimiento de las células del fondo del pocillo (++)

### **6.2.3. Selección de cepas bacterianas para ensayos de infección.**

Para este estudio se seleccionaron 8 cepas representativas de los grupos de AFLP más grandes no identificados analizados en el Capítulo 4 del presente trabajo así como las cepas tipo de las tres nuevas especies (Tabla 6.1).

**Tabla 6.1.** Cepas seleccionadas para los ensayos de patogenicidad.

Cluster <sup>a</sup>	Cepa Código USC	Códigos LMG, CECT ó R	Origen
5	VB 11.11	LMG 23856, CECT 7223	<i>R. philippinarum</i>
9	RD 8.15	LMG 23850, CECT 7224	<i>R. decussatus</i>
16	RD 9.17	R 33634	<i>R. decussatus</i>
26	VB 10.8	CECT 7225	<i>R. philippinarum</i>
37	RD 15.11 <sup>T</sup>	LMG 23858 <sup>T</sup> , CECT 7222 <sup>T</sup>	<i>R. decussatus</i>
48	VB 8.9 <sup>T</sup>	LMG 24045 <sup>T</sup> , CECT 7244 <sup>T</sup>	<i>R. philippinarum</i>
70	VB 11.8	LMG 23865, CECT 7226	<i>R. philippinarum</i>
86	CMJ 11.1 <sup>T</sup>	LMG 23869 <sup>T</sup> , CECT 7228 <sup>T</sup>	<i>R. philippinarum</i>

<sup>a</sup>Los “clusters” 37, 48 y 86 se corresponden con las nuevas especies *V. breoganii*, *V. gallaecicus* y *A. finisterrae*, respectivamente.

### **6.2.4. Infección in vivo en larvas de almeja japonesa.**

Los experimentos se llevaron a cabo en microplacas de cultivo celular (Nunc) de 6 pocillos siguiendo la metodología desarrollada en nuestro laboratorio (Prado 2006). Las larvas de almeja japonesa se obtuvieron del Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo. Se repartieron en los pocillos con 10 ml de agua de mar estéril, a una densidad final de ~10 larvas/ml. Las placas se incubaron en un agitador orbital (100 rpm) a temperatura ambiente ( $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Las larvas no se alimentaron durante el experimento.

Los aislados bacterianos se cultivaron en placas de AM a una temperatura de  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Se prepararon suspensiones de las distintas cepas de *Vibrio* en agua de mar estéril, ajustando la densidad a la escala MacFarland (tubo 3:  $9,0 \times 10^8$  cel/ml). Se realizaron las diluciones apropiadas para obtener unas concentraciones finales en los pocillos de  $10^6$  y  $10^4$  cel/ml. Como controles negativos se mantuvieron pocillos sin añadir bacterias. Cada dosis de cada inoculación se realizó por duplicado.

Las larvas se examinaron mediante microscopía óptica (40x y 100x) y se consideraron dos tipos de efectos:

1. Larvas vivas, que nadaban o con movimiento interno aunque tuvieran las valvas cerradas.
2. Larvas muertas con las valvas cerradas sin movimiento interno.

### **6.2.5. Infección in vivo en almejas adultas (fina y japonesa) por baño.**

Las almejas fina y japonesa se obtuvieron de la Ría de Pontevedra. Antes de la inoculación se realizó un análisis microbiológico y una evaluación por PCR específica para *V. tapetis*, por si contenían una carga bacteriana elevada o portaban este patógeno.

Los aislados bacterianos se cultivaron en placas de AM a  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Se prepararon suspensiones de las distintas cepas de *Vibrio* en SS, ajustando a una densidad óptica de 0,8 a una longitud de onda de 580 nm. Se realizaron diluciones para inocular

las almejas a concentraciones finales de aproximadamente  $10^7$  y  $10^5$  cel/ml. Se realizaron siembras en placas de AM para ver la dosis real inoculada. Se infectaron un total de 15 almejas por dosis en tanques independientes. Se añadió 1 litro de agua de mar sin esterilizar con aireación constante, y posteriormente la suspensión bacteriana asegurándose una mezcla homogénea. La inoculación duró 1 hora, se observó si los ejemplares abrían las valvas para filtrar el agua de mar con las bacterias. Posteriormente las almejas se dejaron 2 h en seco para asegurarse la incorporación de la bacteria en la cavidad paleal, y finalmente se colocaron en sus tanques respectivos de 90 x 50 cm con aproximadamente 10 litros de agua de mar cada uno. Cada tanque se mantuvo con aireación constante a una temperatura de  $18\pm 1^\circ\text{C}$  durante 15 días. Se mantuvo un control tratando las almejas de la forma descrita sin añadir la suspensión bacteriana.

El agua de los tanques se renovó completamente cada 3 días. Las almejas se alimentaron diariamente con una suspensión de microalgas *Isochrysis* spp. y *Tetraselmis suecica* a partes iguales (20 ml de cada una en fase exponencial). Las almejas muertas o moribundas se retiraron diariamente de los tanques y se sometieron a un análisis microbiológico clásico con el fin de reaislar la cepa inoculada.

#### ***6.2.6. Infección in vivo de almeja adulta (fina y japonesa) por inyección intravalvar.***

Las almejas japonesas infectadas con los aislados RD 8.15 y VB 11.8 en el experimento de infección por baño no abrieron las valvas, por lo que se decidió realizar la inoculación mediante inyección intravalvar.

La metodología de infección seguida fue la descrita por Castro y col. (1997). Se preparó la suspensión bacteriana de cada cepa y se inyectaron dos dosis (concentraciones finales de  $10^7$  y  $10^5$  cel/ml) en la cavidad paleal de almejas fina y japonesa. La inoculación se efectuó con una jeringuilla de insulina con la aguja recortada para evitar dañar el manto del bivalvo. Una vez inoculadas, las almejas se mantuvieron fuera del agua durante 3 h para asegurarse la incorporación de la bacteria en la cavidad paleal.

Las almejas se mantuvieron en tanques separados de 21 x 21 cm con aproximadamente 3 litros de agua cada uno. Las condiciones fueron las mismas que en el apartado anterior, excepto la temperatura que en este caso fue de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ . La duración del experimento fue de 8 días. Las almejas muertas o moribundas se muestrearon de la misma forma que en el experimento de infección por baño.

Para ver si los resultados eran estadísticamente significativos se empleó la prueba estadística de contraste de hipótesis. El nivel de significación se estableció siguiendo los comentarios del estadístico Fisher. La fórmula que da el dato estadístico es la siguiente:

Si  $|p_1 - p_2| > Z_{\alpha-0.05} \times \text{error estándar}$ , concluimos que la diferencia es significativa.

$p_n$  = porcentaje de respuesta en decimales.

$$Z_{\alpha-0.05} = 1.96, p = (p_1 - p_2) / 2$$

$$\text{Error estándar} = \sqrt{p(1-p)(1/n_1 + 1/n_2)}$$

### 6.3. RESULTADOS

#### 6.3.1. Factores de virulencia.

##### a) Cepas no asignadas a ningún cluster de AFLP.

Las actividades enzimáticas generales de los ECP se evaluaron mediante el sistema API ZYM. En general, se registró una alta variabilidad en los perfiles enzimáticos de los distintos aislados (Tabla 6.2). No se detectó actividad  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucoronidasa,  $\beta$ -glucosidasa,  $\alpha$ -mannosidasa y  $\alpha$ -fucosidasa. En la prueba  $\alpha$ -galactosidasa sólo se registró actividad en la cepa VB 13.8. La mayoría de los ECP fueron positivos en la prueba fosfatasa alcalina con excepción de 4 cepas (VB 13.8, VB 10.3, CMJ 11.2 y

CMJ 8.17). Los ECP con mayor actividad fueron de los aislados CMF 10.2, CMJ 9.16, RD 18.3 y CMJ 8.17.

Los ECP fueron en general poco reactivos en las pruebas de actividades enzimáticas específicas en placa. No se obtuvo ninguna reacción positiva en las pruebas de Tween 80 y DNasa. Los aislados VB 17.12 y CMJ 8.17 fueron los más citotóxicos a las 24 h en la línea celular SAF-1. Los ECP de la cepa VB 17.12 fueron los más reactivos, con resultados positivos en la hidrólisis de Tween 20, gelatinasa y caseinasa; y los ECP de la cepa CMJ 8.17 mostraron la mayor actividad caseinasa (Tabla 6.3). En general, los valores más altos en las actividades proteolíticas de los ECP coincidieron con la destrucción total en los ensayos de citotoxicidad, con las excepciones de las cepas RD 14.2 y VB 17.1 que no mostraron actividades enzimáticas pero sí destrucción total en la línea celular (Tabla 6.3).

b) Cepas en clusters de AFLP.

Los perfiles de las actividades enzimáticas de los ECPs mediante el sistema API ZYM mostraron variabilidad dentro de cada cluster (Tabla 6.4). Todos los perfiles dieron negativos para las pruebas: lipasa, cistina arilamidasa,  $\alpha$ -galactosidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucoronidasa,  $\beta$ -glucosidasa,  $\alpha$ -manosidasa y  $\alpha$ -fucosidasa. La prueba  $\alpha$ -glucosidasa sólo fue positiva para la cepa C 6.9.

Dentro del cluster 19 con 8 aislados, sólo se obtuvieron dos perfiles idénticos (cepas CMB 4.1 y VB 5.20), siendo los ECP de los aislados RD 7.7 y VB 10.10 los menos reactivos. En este grupo, la prueba fosfatasa ácida fue positiva para todos los ECPs menos para la cepa VB 14.16; y sólo en dos casos se observó actividad N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa (VB 14.16 y C 16.14).

**Tabla 6.2.** Perfiles obtenidos con el sistema miniaturizado API ZYM para los ECPs de *Vibrio* no asignadas a ningún cluster.

Cepa	Actividad <sup>a</sup>																			
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
VB 8.4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
VB 13.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	
VB 10.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CMJ 11.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
CMF 10.2	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
VB 17.12	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CMJ 9.16	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
CMF 10.15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
RD 14.2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CMJ 12.17	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C 8.18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
RD 18.3	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
VB 17.1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CMJ 8.17	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
CMJ 11.3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
CMF 7.8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	

<sup>a</sup> 2, fosfatasa alcalina; 3, esterasa; 4, esterasa-lipasa; 5, lipasa; 6, leucina arilamidasa; 7, valina arilamidasa; 8, cistina arilamidasa; 9, tripsina; 10,  $\alpha$ -quimiotripsina; 11, fosfatasa ácida; 12, fosfohidrolasa; 13,  $\alpha$ -galactosidasa; 14,  $\beta$ -galactosidasa; 15,  $\beta$ -glucoronidasa; 16,  $\alpha$ -glucosidasa; 17,  $\beta$ -glucosidasa; 18, N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa; 19,  $\alpha$ -manosidasa; 20,  $\alpha$ -fucosidasa.

**Tabla 6.3.** Características enzimáticas y citotóxicas *in vitro* de los ECPs de aislados de *Vibrio* no asignados a ningún cluster. <sup>a</sup> T20, Tween 20; T80, Tween 80; Gel, Gelatinasa; Ami, amilasa; Cas, caseinasa, <sup>b</sup> DP, destrucción parcial; DT, destrucción total.

Cepa	Proteína total (µg/ml)	Actividad Proteolítica (U/ml)	Actividades enzimáticas <sup>a</sup>						Citotoxicidad <sup>b</sup> 24 / 48 h
			T20	T80	GEL	AMI	CAS	DNasa	
<b>VB 8.4</b>	555,50	-	-	-	-	-	-	-	- / DP
<b>VB 13.8</b>	759,00	-	-	-	-	-	-	-	- / DP
<b>VB 10.3</b>	375,50	0,02	-	-	-	-	-	-	- / DP
<b>CMJ 11.2</b>	604,70	-	-	-	-	-	-	-	- / -
<b>CMF 10.2</b>	497,50	-	-	-	-	-	-	-	- / DP
<b>VB 17.12</b>	298,60	10,94	++	-	++	-	++	-	<b>DT / DT</b>
<b>CMJ 9.16</b>	435,20	0,94	+	-	-	-	-	-	- / DP
<b>CMF 10.15</b>	491,90	0,13	-	-	+	-	-	-	- / -
<b>RD 14.2</b>	440,20	-	-	-	-	-	-	-	DP / <b>DT</b>
<b>CMJ 12.17</b>	478,60	-	-	-	-	-	-	-	- / -
<b>C 8.18</b>	827,50	0,20	-	-	(+)	+	-	-	DP / DP
<b>RD 18.3</b>	699,10	5,92	+	-	(+)	+	-	-	DP / <b>DT</b>
<b>VB 17.1</b>	465,20	-	-	-	-	-	-	-	DP / <b>DT</b>
<b>CMJ 8.17</b>	671,90	10,22	-	-	-	-	+++	-	<b>DT / DT</b>
<b>CMJ 11.3</b>	480,80	-	-	-	-	+	-	-	- / -
<b>CMF 7.8</b>	209,70	-	-	-	-	-	-	-	DP / DP



Los perfiles de los ECP de las 2 cepas dentro de los clusters 58 y 67 sólo se diferenciaron en la prueba de la fosfatasa ácida. En el resto de los clusters los perfiles de los ECP fueron variables. Los ECP menos reactivos pertenecen a cepas de los clusters 67, 68, 69, 77 y 82.

Los clusters más citotóxicos fueron el 8, 13, 19 y el 29 (Tabla 6.5). Los ECP de los aislados de los clusters 8 y 13 contienen valores similares en la cantidad de proteína total, actividad proteolítica, actividades enzimáticas y ambos producen una destrucción total en la línea celular SAF-1. De los 8 aislados del cluster 19, 4 (VB 14.16, C 16.14, RD 7.7 y VB 5.20) poseen altos valores en las actividades proteolíticas que coinciden con la destrucción total de la línea celular SAF-1. El resto de los ECPs tienen actividades proteolíticas menores con destrucción parcial. La producción de enzimas es variable, siendo los aislados bastante reactivos excepto la cepa VB 10.10 que no presenta ninguna actividad.

Los dos aislados del cluster 29 con diferentes actividades enzimáticas causan una destrucción total del tapiz aunque presentan baja actividad proteolítica.

Los ECP con menor actividad citotóxica y proteolítica correspondieron a los clusters 6, 58, 67, 69 y 77. El resto produjeron una destrucción parcial del tapiz. En los clusters 68 y 82 se apreciaron distintos grados de citotoxicidad.

**Tabla 6.4.** Perfiles obtenidos para los ECPs de *Vibrio* de diferentes clusters de AFLP con el sistema miniaturizado API ZYM.

Cluster	Cepa	Actividad <sup>a</sup>																			
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
6	RD 13.11	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
8	VB 18.7	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	RD 18.9	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13	C 16.16	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13	VB 17.3	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
19	VB 14.16	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
19	C 16.14	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
19	C 16.4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
19	CMJ 12.9	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
19	VB 10.10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
19	CMB 4.1	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
19	RD 7.7	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
19	VB 5.20	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
28	RD 18.1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
28	RD 6.4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
29	CMF 12.14	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
29	RD 11.20	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
47	C 6.9	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	
58	RD 12.10	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
58	C 14.12	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
67	CMJ 13.18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
67	CMF 13.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
68	RD 13.7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
68	C 16.17	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
69	CMF 5.10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
77	RD 3.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
82	CMF 7.5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
82	CMF 13.13	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

<sup>a</sup>Pruebas igual que en la Tabla 6.2.

Tabla 6.5. Características enzimáticas y citotóxicas *in vitro* de los ECPs de aislados de *Vibrio* en diferentes clusters de AFLP.<sup>a, b</sup> Características igual que en la Tabla 6.3.

Cluster	Cepa	Identificación AFLP	Proteína total ( $\mu$ g/ml)	Actividad Proteolítica (U/ml)	Actividades enzimáticas <sup>a</sup>						Citotoxicidad <sup>b</sup> 24 / 48 h
					T20	T80	GEL	AMI	CAS	DNasa	
6	RD 13.11	<i>V. splendidus</i>	808,00	0,64	-	-	-	-	-	-	- / DP
8	VB 18.7	<i>V. crassostreae</i>	415,20	8,91	-	-	++	+	+++	-	DP / DT
8	RD 18.9	<i>V. crassostreae</i>	478,60	11,26	-	-	++	+	+	-	DT / DT
13	C 16.16	<i>V. chagasii</i>	339,70	10,10	-	-	++	-	++	-	DT / DT
13	VB 17.3	<i>V. chagasii</i>	273,60	13,09	-	-	++	-	++	-	DT / DT
19	VB 14.16	<i>V. cyclitrophicus</i>	394,70	9,72	-	-	++	+	++	-	DP / DT
19	C 16.14	<i>V. cyclitrophicus</i>	388,60	8,87	++	-	++	-	++	-	DP / DT
19	C 16.4	<i>V. cyclitrophicus</i>	195,80	4,2	+	-	+	+	-	-	DP / DP
19	CMJ 12.9	<i>V. cyclitrophicus</i>	466,30	4,48	-	-	+	+	-	-	- / DP
19	VB 10.10	<i>V. cyclitrophicus</i>	304,15	-	-	-	-	-	-	-	DP / DP
19	CMB 4.1	<i>V. cyclitrophicus</i>	238,60	5,67	++	-	+++	-	++	-	DP / DP
19	RD 7.7	<i>V. cyclitrophicus</i>	485,25	8,56	+	-	+	-	++	-	DT / DT
19	VB 5.20	<i>V. cyclitrophicus</i>	506,9	10,27	+	-	+	-	+++	-	DT / DT
28	RD 18.1	<i>V. alginolyticus</i>	301,90	7,58	-	-	+	+	++	-	DP / DP
28	RD 6.4	<i>V. alginolyticus</i>	691,90	-	-	-	-	-	-	-	- / DP
29	CMF 12.14	<i>V. diabolicus</i>	378,60	3,92	-	-	++	+	++	-	DP / DT
29	RD 11.20	<i>V. diabolicus</i>	394,70	0,51	-	-	+	-	-	-	DT / DT
47	C 6.9	<i>V. mediterranei</i>	456,30	0,11	-	-	-	++	-	-	DP / DP
58	RD 12.10	<i>Vibrio sp.</i>	463,60	0,36	-	-	-	+	-	-	- / -
58	C 14.12	<i>Vibrio sp.</i>	518,6	-	-	-	-	-	-	-	- / -
67	CMJ 13.18	<i>Vibrio sp.</i>	263,05	-	-	-	-	-	-	-	- / DP
67	CMF 13.15	<i>Vibrio sp.</i>	360,25	-	-	-	-	-	-	-	- / DP
68	RD 13.7	<i>Vibrio sp.</i>	503,60	-	-	-	-	-	-	-	- / -
68	C 16.17	<i>Vibrio sp.</i>	208,05	0,12	-	-	-	-	-	-	DP / DT
69	CMF 5.10	<i>Vibrio sp.</i>	478,05	1,72	-	-	+	-	-	-	- / DP
77	RD 3.11	<i>Vibrio sp.</i>	310,25	0,20	-	-	-	-	-	-	- / DP
82	CMF 7.5	<i>Vibrio sp.</i>	489,15	0,13	+	-	+	-	-	-	DT / DT
82	CMF 13.13	<i>Vibrio sp.</i>	406,9	0,41	-	-	-	-	-	-	DP / DP

c) Nuevas especies y posibles nuevas especies.

En este caso los perfiles enzimáticos de los ECP fueron en general poco reactivos y variables entre cepas de un mismo cluster (Tabla 6.6). Los ECPs con menos actividad enzimática fueron los clusters 5, 37 y 48, que corresponden con un *Vibrio* sp. y las nuevas especies *V. breoganii* y *V. gallaecicus*. En el cluster 37 (*V. breoganii*) sólo se obtuvo actividad  $\alpha$ -quimiotripsina para la cepa tipo RD 15.11<sup>T</sup>, y fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida para las cepas RD 15.11<sup>T</sup> y VB 16.3. En el cluster 48 las dos cepas analizadas mostraron actividad fosfatasa alcalina, además la cepa C 8.10 utilizó la lipasa. En los clusters 37 (*V. breoganii*) y 48 (*V. gallaecicus*) no se detectó la producción de gelatinasa, caseinasa o DNasa, ni actividades lipolíticas en los sustratos Tween 20 y Tween 80. Ninguna de las cepas mostró actividad proteolítica y produjeron una destrucción parcial del tapiz en la línea celular SAF-1 (Tabla 6.7).

En el cluster 86 (*A. finisterrae*), se observó una baja actividad de la cepa tipo CMJ 11.1<sup>T</sup> sólo positiva para la fosfatasa alcalina y N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa. Por el contrario la cepa C 17.13 mostró actividad fosfatasa alcalina, leucina arilamidasa, valina arilamidasa, tripsina,  $\alpha$ -quimiotripsina y fosfatasa ácida (Tabla 6.6). También mostró actividad enzimática en las pruebas Tween 20, amilasa y caseinasa, y causó una destrucción total de la línea celular (Tabla 6.7).

Se detectó mayor actividad (5-7 reacciones enzimáticas positivas) en los ECP de algunos aislados de los clusters 9, 16, 26 y 70. Las cepas VB 15.4 (cluster 9) y RD 9.17 (cluster 16) mostraron actividad en la fosfatasa alcalina, esterasa-lipasa, leucina arilamidasa, cistina arilamidasa y  $\alpha$ -quimiotripsina. La cepa VB 15.4 también fue positiva para la tripsina y la RD 9.17 para la fosfatasa ácida.

Las cepas VB 10.8 (cluster 26), RD 16.2 y CMF 6.5 (cluster 70) mostraron actividad fosfatasa alcalina, leucina arilamidasa, valina arilamidasa y tripsina. Las dos cepas del cluster 70 también mostraron actividad para la  $\alpha$ -quimiotripsina y fosfatasa ácida; y la cepa CMF 6.5 para la esterasa lipasa (Tabla 6.6). La prueba fosfatasa ácida fue positiva para todos los ECP de las cepas del cluster 70.

Los ECP de los aislados de los cluster 9 y 70 mostraron mayor actividad enzimática en placa. Las 3 cepas del cluster 9 causaron una destrucción total de la línea celular SAF-1 mientras que las cepas del cluster 70 presentaron una destrucción parcial de los tejidos (Tabla 6.7).

**Tabla 6.6.** Perfiles obtenidos para las cepas de *Vibrio* (nuevas especies descritas y posibles nuevas especies) con el sistema miniaturizado API ZYM. )

Cluster	Cepa	Actividad <sup>a</sup>																			
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
5	VB 11.11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9	RD 8.15	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
9	VB 15.4	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
9	RD 16.13	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16	RD 9.17	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
26	VB 10.8	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
37	RD 15.11 <sup>T</sup>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
37	VB 16.3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
37	C 5.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
37	RD 2G5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
48	VB 8.9 <sup>T</sup>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
48	C 8.10	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
70	RD 16.2	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
70	VB 11.8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
70	RD 14.14	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
70	CMF 6.5	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
70	CMF 5.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
86	CMJ 11.1 <sup>T</sup>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
86	C 17.13	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

<sup>a</sup>Pruebas igual que en la Tabla 6.2.

Capítulo VI

Tabla 6.7. Características enzimáticas y citotóxicas *in vitro* de los ECPs de aislados de *Vibrio* (nuevas especies descritas y posibles nuevas especies).<sup>a,b</sup> Características igual que en la Tabla 6.3.

Cluster	Cepa	Identificación	Proteína total (g/ml)	Actividad Proteolítica (U/ml)	Actividades enzimáticas <sup>a</sup>					Citotoxicidad <sup>b</sup>	
					T20	T80	GEL	AMI	CAS	DNasa	24/48 h
5	VB 11.11	<i>Vibrio</i> sp.	565,83	-	-	-	-	+	-	-	-
9	RD 8.15	<i>Vibrio</i> sp.	463,05	1,61	+	-	-	+	-	-	-
9	VB 15.14	<i>Vibrio</i> sp.	614,15	-	-	-	(+)	-	NT	-	DT / DT
9	RD 16.13	<i>Vibrio</i> sp.	534,10	0,35	+	-	+	-	-	-	DT / DT
16	RD 9.17	<i>Vibrio</i> sp.	485,83	2,22	+	-	-	+	+	-	DP
26	Vb 10.8	<i>Vibrio</i> sp.	447,50	1,61	-	-	-	+	(+)	-	DP
37	RD 15.11 <sup>t</sup>	<i>V. breoganii</i>	236,35	-	-	-	-	-	-	-	DP / DP
37	VB 16.3	<i>V. breoganii</i>	250,25	-	-	-	-	-	-	-	DP / DP
37	C 5.5	<i>V. breoganii</i>	275,80	0,21	-	-	-	-	-	-	- / DP
37	RD 2G5	<i>V. breoganii</i>	271,90	-	-	-	-	-	-	-	- / DP
48	VB 8.9 <sup>t</sup>	<i>V. gallaecicus</i>	716,35	-	-	-	-	-	-	-	- / DP
48	C 8.10	<i>V. gallaecicus</i>	374,50	0,02	-	-	-	-	-	-	DP / DP
70	RD 16.2	<i>Vibrio</i> sp.	486,35	13,09	-	-	++	-	++	-	DP / DP
70	VB 11.8	<i>Vibrio</i> sp.	519,70	-	-	-	-	-	-	-	- / DP
70	RD 14.14	<i>Vibrio</i> sp.	416,90	-	-	-	-	-	-	-	- / DP
70	CMF 6.5	<i>Vibrio</i> sp.	371,35	-	++	-	+	+	-	-	- / DP
70	CMF 5.9	<i>Vibrio</i> sp.	261,35	0,07	-	-	+	-	-	-	- / DP
86	CMJ 11.1 <sup>t</sup>	<i>A. finisterrae</i>	721,94	-	-	-	-	-	-	-	-
86	C 17.13	<i>A. finisterrae</i>	783,61	5,18	+	-	-	+	+	-	DT

### **6.3.2. Ensayos de patogenicidad en larvas de almeja.**

En los experimentos de patogenicidad realizados con larvas de almeja japonesa ninguna de las cepas evaluadas ocasionó mortalidad. Todas las larvas nadaban normalmente sin cerrar las valvas.

### **6.3.3. Ensayos de patogenicidad en almejas adultas.**

Los ensayos de PCR que se realizaron en búsqueda del patógeno *V. tapetis* antes de experimentos de infección dieron resultados negativos, demostrando la ausencia del patógeno bacteriano. No se apreció una elevada carga bacteriana en los medios AM ( $10^5$ - $10^4$  UFC/ml) ni TCBS ( $10^4$ - $10^3$  UFC/ml).

#### **6.3.2.1. Infección por baño.**

Se realizaron ensayos de infección para determinar la patogenicidad de los 8 vibrios seleccionados en ejemplares adultos de almeja japonesa y fina, inoculando por baño dos dosis diferentes (aprox.  $10^8$ - $10^7$  y  $10^6$ - $10^5$  UFC/ml). Al cabo de 15 días después de la inoculación las mortalidades fueron aleatorias, sin relación con la dosis inoculada, no siendo significativas con respecto al tanque control (Tablas 6.8 y 6.9). Las mortalidades en almeja japonesa fueron escasas, contrastando con las obtenidas en almeja fina que fueron elevadas, en algunos casos hasta el 100% de mortalidad.

En los tanques inoculados con las cepas RD 8.15 y VB 11.8 se observó que ninguna almeja japonesa abrió las valvas en el proceso de infección pudiendo indicar la presencia de algún producto extracelular que causara este efecto; por tanto el grado de susceptibilidad a la infección se evaluó mediante inoculación intravalvar.

**Tabla 6.8.** Mortalidades de almeja japonesa producidas por las cepas de *Vibrio* inoculadas.

Cluster de AFLP	Cepa	Dosis inoculada (UFC/ml)	Nº de ejemplares	Total de mortalidades
5	VB 11.11	7,4 x 10 <sup>7</sup>	15	2
		7,4 x 10 <sup>5</sup>	15	4
9	RD 8.15	1,0 x 10 <sup>8</sup>	15	1
		1,1 x 10 <sup>6</sup>	15	1
16	RD 9.17	1,1 x 10 <sup>8</sup>	15	1
		1,1 x 10 <sup>6</sup>	15	1
26	VB 10.8	9,9 x 10 <sup>7</sup>	15	0
		9,9 x 10 <sup>5</sup>	15	2
37	RD 15.11 <sup>T</sup>	2,7 x 10 <sup>7</sup>	15	1
		2,7 x 10 <sup>5</sup>	15	1
48	VB 8.9 <sup>T</sup>	7,0 x 10 <sup>7</sup>	15	0
		7,0 x 10 <sup>5</sup>	15	1
70	VB 11.8	5,6 x 10 <sup>7</sup>	15	1
		5,6 x 10 <sup>5</sup>	15	1
86	CMJ 11.1 <sup>T</sup>	2,0 x 10 <sup>7</sup>	15	1
		2,0 x 10 <sup>5</sup>	15	1
	Control	-	15	0
		-	15	1



**Tabla 6.9.** Mortalidades de almeja fina producidas por las cepas de *Vibrio* inoculadas.

Cluster de AFLP	Cepa	Dosis inoculada (UFC/ml)	Nº de ejemplares	Total de mortalidades
5	VB 11.11	4,0 x 10 <sup>8</sup>	15	15
		4,0 x 10 <sup>6</sup>	15	13
9	RD 8.15	4,6 x 10 <sup>7</sup>	15	15
		4,6 x 10 <sup>5</sup>	15	12
16	RD 9.17	1,66x 10 <sup>8</sup>	15	12
		1,6 x 10 <sup>6</sup>	15	11
26	VB 10.8	1,3 x 10 <sup>8</sup>	15	13
		1,3 x 10 <sup>6</sup>	15	12
37	RD 15.11 <sup>T</sup>	1,7 x 10 <sup>8</sup>	15	9
		1,7 x 10 <sup>6</sup>	15	13
48	VB 8.9 <sup>T</sup>	4,3 x 10 <sup>7</sup>	15	12
		4,3 x 10 <sup>5</sup>	15	12
70	VB 11.8	2,9 x 10 <sup>8</sup>	15	12
		2,9 x 10 <sup>6</sup>	15	14
86	CMJ 11.1 <sup>T</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>	15	13
		1,2 x 10 <sup>5</sup>	15	11
	Control	-	15	14
		-	15	13

#### 6.3.2.1. Infección por inyección intravalvar.

Se registraron mortalidades en todos los tanques (Tabla 6.10), tanto en almeja japonesa como fina. En el tanque infectado con la cepa RD 8.15 la mortalidad de almeja japonesa 4 días después de la infección fue total con ambas dosis. En el caso de la almeja fina la mortalidad del 100% se produjo a los 3 días con la dosis alta y a los 4 con la dosis baja. Con la cepa VB 11.8 la mortalidad para la almeja japonesa fue mayor con la dosis más elevada, pero igual para la almeja fina. Hay que señalar que en los tanques control también se registraron mortalidades elevadas. Se evaluó si las mortalidades fueron estadísticamente significativas.

**Tabla 6.10.** Porcentajes de mortalidad en almeja adulta (japonesa y fina) después de inocular los aislados de *Vibrio* vía intravalvar.

Cepa	Almeja japonesa		Almeja fina	
	Dosis inoculada (UFC/ml)	Porcentajes de mortalidad	Dosis inoculada (UFC/ml)	Porcentajes de mortalidad
RD 8.15	$7,90 \times 10^6$	100*	$1,20 \times 10^7$	100*
	$7,90 \times 10^4$	100*	$1,20 \times 10^5$	100*
VB 11.8	$5,74 \times 10^6$	80	$5,00 \times 10^6$	80
	$5,74 \times 10^4$	33.3	$5,00 \times 10^4$	80
Control	-	64.3	-	60
	-	33.3	-	66

\*Los asteriscos indican resultados con diferencia significativa con respecto a los controles.

Las mortalidades obtenidas tanto en almeja fina como en japonesa fueron significativas con respecto al tanque control sólo con la cepa RD 8.15. La cepa inoculada pudo recuperarse de las almejas muertas estableciéndose su patogenicidad en almejas.

#### 6.4. DISCUSIÓN

Con el fin de determinar la virulencia de cepas del género *Vibrio* se realizó un estudio de los ECP de 57 aislados previamente caracterizadas por AFLP. Para ello se evaluaron *in vitro* las actividades enzimáticas generales mediante el sistema API ZYM, la actividad proteolítica, la presencia de enzimas en placa, y la citotoxicidad en la línea celular de dorada SAF-1.

Los resultados obtenidos en la caracterización de las actividades enzimáticas mediante el sistema API ZYM mostraron una baja actividad en la mayoría de los ECP de las cepas analizadas. La alta variabilidad registrada entre los perfiles enzimáticos de los

distintos aislados no permitió establecer una relación entre el perfil enzimático y los “clusters” de AFLP.

En relación con los ensayos de las actividades enzimáticas mediante el método de difusión radial en placa, las actividades proteolíticas y la citotoxicidad en la línea celular SAF-1, se observaron respuestas variables en los ECP de los distintos aislados analizados. En general se observó correlación entre valores altos en la actividades proteolíticas, actividades enzimáticas y destrucción total o parcial en el tapiz de la línea celular SAF-1.

Se demostró la citotoxicidad de las cepas identificadas por AFLP como *V. crassostreae*, *V. chagasii*, *V. cyclitrophicus* y *V. diabolicus*. Hasta ahora no se ha demostrado el potencial patogénico de estas especies en bivalvos, por tanto serían necesarios estudios de inoculación *in vivo* para ver si existe relación entre su potencial citotóxico y patogénico.

En el Capítulo 5 se evaluaron las actividades enzimáticas mediante el sistema API ZYM y por el método de difusión en placa de las cepas de las 3 nuevas especies con célula completa. Comparando los resultados con los obtenidos mediante los ECPs en este Capítulo se observan importantes diferencias.

Con respecto a los resultados del API ZYM se observa una mayor actividad con célula completa que con los ECPs en las tres especies descritas. Con respecto a los resultados en placa las cepas de *V. breoganii* mostraron los mismos resultados, sin actividad en ninguna de las enzimas evaluadas. En los aislados de *V. gallaecicus* se obtuvo actividad en las pruebas enzimáticas Tween 80, gelatinasa, amilasa y DNasa sólo con célula completa. En los aislados de *A. finisterrae* la cepa tipo CMJ 11.1<sup>T</sup> utilizó los enzimas Tween 80 y DNasa con célula completa pero no con los ECP. Sin embargo, los ECP de la cepa C17.13 mostraron mayor actividad en la hidrólisis de almidón. En general se obtuvo mayor actividad enzimática mediante el método de célula completa lo cual sugiere la posibilidad de otros factores, además de los ECP implicados en la interacción

bacteria-hospedador.

El siguiente paso fue evaluar la virulencia de 8 cepas de vibrios para fases larvarias y adultas de almeja fina y japonesa. Los ensayos de infección experimental se realizaron con las cepas VB 11.11, RD 8.15, RD 9.17, VB 10.8, VB 11.8, y las tres cepas tipo de las nuevas especies RD 15.11<sup>T</sup>, VB 8.9<sup>T</sup>, y CMJ 11.1<sup>T</sup>. Los resultados obtenidos tanto en larvas como en almejas adultas inoculadas por baño demostraron que ninguna fue virulenta ya que la mayoría sobrevivieron a las inoculaciones de las 8 cepas a las dos dosis ensayadas.

Por el contrario cuando la cepa RD 8.15 se inoculó via intravalvar tanto en almeja fina como en japonesa. Se produjo un 100% de mortalidad a los 4 días de la infección en almeja japonesa y a los 3 días en almeja fina. El mismo ensayo se realizó con la cepa VB 11.8, no obteniéndose resultados estadísticamente significativos con respecto a las almejas muertas en los tanques control.

Existen controversias cuando se intenta establecer una relación positiva entre la virulencia de una cepa y la presencia de citotoxinas en sus ECP. Algunos autores han encontrado una relación directa entre la respuesta citotóxica y la virulencia (Fouz 1993, Balebona y col. 1998), pero en otros casos la relación no ha podido ser establecida (Toranzo y col 1983, Santos y col. 1991). En este caso sólo se demostró la correspondencia entre la capacidad citotóxica de los ECP y la virulencia de la cepa en almejas para la cepa RD 8.15.

Es importante considerar que las bacterias pueden no producir los mismos factores de virulencia *in vitro* que *in vivo* (Toranzo y Barja 1993). También se puede dar el caso que las proteínas bacterianas que se expresan durante el crecimiento en un medio de cultivo no sean necesariamente las mismas que aquellas que se expresan dentro del hospedador (Smith 1984). Hay que destacar además que la enfermedad es el resultado de una interacción patógeno-hospedador-ambiente, por lo que el estado inmunológico y fisiológico del hospedador ejerce un papel determinante en el desenlace de la

enfermedad. En el laboratorio los experimentos *in vivo* no presentan las mismas condiciones que en el medio natural pudiendo en algunos casos afectar a la determinación de la capacidad virulenta de cepas bacterianas.

El estudio de los mecanismos celulares implicados en los procesos de infección ayudaría a identificar las estrategias de invasión y patogénesis utilizadas por estos microorganismos, y contribuiría al entendimiento de las relaciones hospedador-patógeno en las infecciones por vibrios.

**VI. VIBRIOS. STUDY OF PATHOGENICITY AND  
VIRULENCE FACTORS**

## **6. VIBRIOS: DETERMINATION OF VIRULENCE FACTORS AND INFECTIONS *in vivo*.**

Under intensive culture conditions, marine species are exposed to various stressors, including bacterial pathogens. Among possible sources of bacterial infections, *Vibrio* spp. are often associated with diseases in larval and adult stages of bivalves. Therefore it seems necessary the performance of infection assays *in vivo* as well as the study of virulence factors of new species associated with the culture of clams.

The main characteristics that determine bacterial pathogenicity are their capability to fix and colonize specific host sites, as well as the synthesis of harmful substances such as the extracellular products (ECP). *Vibrio* ECP include extracellular enzymes (gelatinase, elastase, lecithinase, lipase, etc.), citolysines, citotoxines, hemolysines, hemoglutines and thermostable toxins (Baffone *et al.* 2000).

Most of the studies on ECP of *Vibrio* spp. have been related mainly to their virulence on fish (Toranzo & Barja 1993). Various works have been performed with toxicity assays of *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum* on turbot, trout and salmon (Toranzo & Barja 1990, Romalde *et al.* 1990, Santos *et al.* 1991) or with *Vibrio vulnificus* in eels (Biosca & Amaro 1996).

In the past, the virulence of pathogenic *Vibrio* spp. in bivalve molluscs was shown to be related to their ability to produce ECP (Elston & Leibovitz 1980, Nottage & Birbeck 1986). According to Maeda and Yamamoto (1996), these ECP, mostly consisting of proteases, could facilitate the propagation of the bacteria by causing extensive host tissue damage. Furthermore, ECP could also counteract the host defense system by degrading immunoglobulins and other components.

Labreuche *et al.* (2006b) described the toxicity of ECP from a pathogenic *V. aestuarianus* strain in oysters (*C. gigas*), and evaluated the immune cellular response *in vitro*. They demonstrated the hemocyte's immunodeficiency in the presence of the ECP of *V. aestuarianus*, reducing hemocyte adhesion properties and phagocytosis. The bacterial pathogen avoids the phagocytic activity of the oyster, divides and colonizes causing death.

Gómez-León *et al.* (2005) performed an *in vivo* experiment with *V. splendidus* y *V. alginolyticus* strains on clam larvae (*R. decussatus*). The mortalities were explained as a consequence of bacterial infection. They demonstrated the ECP of both species have cytotoxic activity and reduce clams hemocytes' survival after 24 h of incubation. They suggested that the ECP of both species interfere in the bacterial pathogenesis and that *V. alginolyticus* strains were more virulent as a consequence of siderophore activity.

In a later study Gómez-León *et al.* (2008) performed *in vivo* infection experiments with two *Vibrio* strains and one *Roseovarius crassostreae* in oysters (*C. virginica*). The three strains caused mortalities, increasing with temperature but decreasing with the size of the oysters. They demonstrated the ECP toxicity is similar for the three strains in all life stages of the oyster but suggested that the differences in the resistance to bacterial pathogenesis is a consequence of the solid external barriers attained with the size of the individuals.

Until today the interactions between clams and *Vibrio* species have not been extensively investigated. The aims of this Chapter were first to analyze some ECP that may be involved in the virulence and cytotoxicity of the *Vibrio* species analyzed, and secondly to perform *in vivo* infection experiments on clams in order to determine the degree of virulence of the *Vibrio* strains studied.

The ECP of 57 isolates previously characterized by AFLP were analyzed. Enzymatic activities were evaluated *in vitro* by the API ZYM methodology and diffusion on agar



plates, proteolytic activity was measured and cytotoxicity was assayed on the sea bream cell line SAF-1.

The strains evaluated were distributed into three main groups: a) Strains not assigned into any specific AFLP group (Tables 6.2 and 6.3), b) Strains in AFLP groups (Tables 6.4 and 6.5), and c) strains classified as new species or possible new species (Tables 6.6 and 6.7).

In general API ZYM enzymatic profiles were highly variable with scarce positive reactions and could not be related to any specific AFLP clusters. A positive relationship was found between specific enzymatic activities performed on agar plates, proteolytic activity and cytotoxicity on the cell line SAF-1. Positive enzymatic responses and high values of proteolytic activity corresponded to cytotoxic activity causing total or partial destruction of the cell line.

Cytotoxic effects were found in strains identified by AFLP as *V. crassostreae*, *V. chagasii*, *V. cyclitrophicus* and *V. diabolicus*. Until now these species have not been described as pathogenic in bivalve species, further infection assays would verify if there is a relationship between their cytotoxic and pathogenic potential.

The ECP of *V. breoganii* (cluster 37) and *V. gallaecicus* (cluster 48) strains had practically non enzymatic and low proteolytic activities producing partial destruction on the cell line SAF-1 (Tables 6.6 and 6.7). For the cluster 86 (*A. finisterrae*), the ECPs for the type strain CMJ 11.1<sup>T</sup> showed low enzymatic, proteolytic and cytotoxic activity. In contrast the strain C 17.13 had more positive enzymatic reactions, high proteolytic activity and caused total destruction of the cell line SAF-1 (Table 6.7). In Chapter 5 of this Thesis this strain has also been considered phenotypically and genetically different from the rest of the strains in the cluster.

Enzyme production in the 3 new species was found to be higher when performed with whole cells (performed in Chapter 5) than with the ECP, this may indicate the presence of other factors involved in the interaction host-bacteria.

API-ZYM profiles were more reactive for the ECP of the strains in the clusters 9, 16, 26 and 70, considered as potentially new species. Strains from clusters 9 and 70 also displayed specific enzymatic activities on agar plates causing total and partial destruction of the cell line respectively.

The next step in this study was to evaluate the virulence of 8 *Vibrio* strains in Manila and Carpet shell clams (*R. philippinarum* and *R. decussatus*) for both larvae and adult life stages. Infection trials were performed on the strains VB 11.11, RD 8.15, RD 9.17, VB 10.8, VB 11.8 and on the type strains of the new species RD 15.11<sup>T</sup>, VB 8.9<sup>T</sup> and CMJ 11.1<sup>T</sup>. Infection was performed by immersion.

Results obtained for the larvae and adult experiments demonstrated that the strains inoculated at two different concentrations ( $10^7$  and  $10^5$  cel/ml) were not virulent. Larvae survived with normal movement in the presence of the bacteria. For Manila adult clams most survived in the experimental challenge, for Carpet Shell clams high mortalities were obtained, being however not significantly different from those in the control tank.

In the immersion trials, adult Manila clams showed no signs of opening the valves in the presence of the strains RD 8.15 and VB 11.8. This could indicate the possible presence of an extracellular substance causing this reaction. Infection assays were performed by intra-valvar injection on these two strains in order to seek for any virulence activity.

Infection assays with the strain RD 8.15 by injection produced 100% mortality after 4 days for Manila clams, and after 3 days for Carpet Shell clams. The strain was isolated from dead organisms. No significant results were obtained for the strain VB 11.8 with respect to mortalities in the control tank.

To determine the virulence of a strain is important to establish a positive reaction with the presence of the cytotoxic ECP. Some authors have found a direct relation between the cytotoxic response and virulence of the strain (Fouz 2003, Balebona *et al.* 1998), however the relation has not always been established (Toranzo *et al.* 1983, Santos *et al.* 1991). In this study correspondence between the cytotoxic effect of the ECPs and virulence of the strain RD 8.15 was achieved.

It's important to consider that bacteria may not produce the same virulence factors *in vitro* as *in vivo* (Toranzo & Barja 1993). Also expressed proteins during growth in the culture media may not be the same ones as when bacteria are inside the host species (Smith 1984). Is important to consider that a disease is the result of an interaction pathogen-host-environment, the physiological and immunological state of the host will play a determinant role in the development of the bacterial disease. Natural habitat conditions are impossible to obtain in laboratory experiments, and may affect the virulence capacity of the bacterial strains examined.



## **VII. CONSIDERACIONES FINALES**

## 7. CONSIDERACIONES FINALES

Uno de los problemas a los que se enfrenta el cultivo de la almeja en Galicia es la aparición de nuevas patologías, principalmente parasitarias y bacterianas. A esto hay que sumar que la elevada mortalidad de la almeja no se puede achacar sólo a un agente patógeno sino a un conjunto de interacciones donde también intervienen las condiciones del medio ambiente. Tal y como ya se ha comentado, algunas especies bacterianas afectan a la supervivencia de poblaciones de almejas cultivadas provocando elevadas pérdidas económicas. En los criaderos resulta más fácil controlar las poblaciones bacterianas presentes en los cultivos, impidiendo la proliferación de patógenos oportunistas que interfieran en el desarrollo larvario. Pero en las zonas de marisqueo para el engorde de la almeja un problema bacteriano es más difícil de resolver, por lo que la solución reside en intentar prevenir la situación catastrófica.

Para poder prevenir una enfermedad bacteriana, lo primero es poseer un amplio conocimiento sobre qué especies son las posibles patógenas. Hasta ahora los estudios sobre la microbiota asociada a poblaciones de almejas cultivadas son escasos, por tanto se hace necesario profundizar en este conocimiento para determinar las especies prevalentes así como su potencial patogénico.

En esta Memoria se ha pretendido ampliar el conocimiento de las especies de *Vibrio* que están asociadas al cultivo de la almeja. El primer paso fue la caracterización fenotípica de los vibrios. Se observó que la diversidad de vibrios en almejas gallegas es grande, aunque con una clara dominancia de algunas especies, principalmente *V. splendidus*, como ocurre en otras áreas geográficas con otros bivalvos cultivados. El 6% de los vibrios analizados no se pudieron identificar a nivel de especie en base únicamente a sus caracteres bioquímicos.

Una vez que los 768 aislados de *Vibrio* se distribuyeron en grupos fenotípicos se seleccionaron 145 cepas representativas y se procedió a una identificación más

completa mediante métodos moleculares. La metodología de AFLP permitió esclarecer muchas especies que estaban enmascaradas en otras, sobretodo en el grupo polifilético *V. splendidus*-like. Se observó una baja coincidencia en las identificaciones realizadas por los métodos fenotípicos y genéticos (29,82%), obteniéndose una diversidad mucho mayor en los resultados obtenidos por AFLP. Por tanto, se demostró que las pruebas bioquímicas realizadas no fueron suficientes o fueron inadecuadas para poder distinguir algunas especies de *Vibrio*.

La técnica de AFLP ha aportado información de importante valor en la identificación de especies en la familia Vibrionaceae (Thompson y col. 2001). El inconveniente reside en el requerimiento de una buena base de datos propia en el laboratorio. Esta técnica ha supuesto un avance en la investigación taxonómica, pero en nuestro caso no se logró identificar a nivel de especie el 60,7% de las cepas analizadas. Este dato indica que, a pesar de que el género *Vibrio* es hoy uno de los más conocidos, todavía pueden existir muchas especies que aún no se han descrito.

De todos los “clusters” de AFLP que no pudieron ser identificados a nivel de especie, se seleccionaron los 8 con el mayor número de aislados para estudiar su filogenia en base al gen 16S rRNA y en los genes “housekeeping” *recA*, *rpoA*, *atpA* y *pyrH*, descritos como buenos marcadores filogenéticos para el género *Vibrio* en estudios anteriores (Thompson y col. 2006).

Los resultados de estos análisis indican que dichos “clusters” podrían constituir nuevas especies de vibrios en diferentes ramas evolutivas del género: 6 en el grupo de *V. splendidus*, una en el grupo *V. haliotocoli* y una en el grupo de los Aliivibrios. El estudio taxonómico se centró en los aislados de los 3 “clusters” con menores porcentajes de similitud en el gen 16S rRNA con respecto a los vibrios más cercanos. Son precisos futuros estudios para dilucidar la posición taxonómica de los “clusters” de AFLP 5, 9, 16 y 70 dentro del grupo *V. splendidus* con altos porcentajes de similitud en el gen 16S rRNA y fenotípicamente muy similares.

El estudio polifásico, que consistió en una detallada descripción de las características bioquímicas, análisis filogenéticos de los distintos genes, y datos de hibridación DNA-DNA, permitió definir la existencia de tres nuevas especies dentro de la familia Vibrionaceae: *Vibrio breoganii* sp. nov., *Vibrio gallaecicus* sp. nov., y *Aliivibrio finisterrae* sp. nov. Se observó una homogeneidad fenotípica y genética de cepas de las tres nuevas líneas filogenéticas, excepto para un aislado de *Aliivibrio* que mostró grandes diferencias con respecto a los otros aislados dentro de la misma especie.

Hasta hoy no se ha encontrado un único gen que logre diferenciar bien entre todas las especies de *Vibrio*, por tanto la elección de un buen marcador filogenético varía dependiendo del grupo de vibrios estudiado (Thompson y col. 2005). Los análisis del MLSA han demostrado que para la especie *V. breoganii* los genes *atpA* y *pyrH* son buenos candidatos como marcadores filogenéticos. En el caso de *V. gallaecicus* y *A. finisterrae*, el gen *recA* demostró tener el mayor poder discriminativo como marcador filogenético. Sin embargo, es de destacar que el concatenado de varios genes ofrece mayor fiabilidad y solidez en la determinación de la posición filogenética de las especies.

Para evaluar la patogenicidad de las 3 nuevas especies y los 5 grupos no identificados mayoritarios estudiados en los Capítulos 4 y 5, se realizaron ensayos de infección experimental en larvas y adultos de almeja (*R. philippinarum* y *R. decussatus*) con una cepa representativa de cada grupo. Los resultados obtenidos en larvas de almeja demostraron que ninguna de las especies inoculadas fue virulenta. Resultados similares se obtuvieron en los experimentos de inoculación por baño con almejas adultas.

Con respecto a los ensayos de inoculación vía intravalvar, se observó que la cepa RD 8.15 resultó ser virulenta. Las mortalidades comenzaron a registrarse a las 24 h alcanzando el 100% a los 4 días en almeja japonesa y a los 3 días en almeja fina. En esta cepa se detectaron actividades enzimáticas de los productos extracelulares, así como una



destrucción total en la línea celular de dorada SAF-1 en los ensayos de citotoxicidad. Por tanto, el potencial patógeno de esta cepa podría estar ligado a la debilidad de los mecanismos de defensa del hospedador como ocurre en el caso de la mortalidad de verano de la ostra relacionada con *V. splendidus* y *V. chagasii* en otros estudios.

En los 8 vibrios utilizados en los experimentos de infección se apreció una destrucción parcial o total de la línea celular en todos menos en la cepa VB 11.11. Las tres nuevas especies mostraron destrucción parcial o total en la mayoría de los casos. No se pudo establecer una relación positiva entre la virulencia de las cepas y sus actividades citotóxicas (con excepción de la cepa RD 8.15).

En relación con los ensayos con el resto de los aislados, se observó una respuesta citotóxica en aislados de *V. cyclitrophicus*, *V. diabolicus*, *V. mediterranei*, *V. crassostreae*, *V. chagasii* y *V. alginolyticus*. En las últimas dos especies ya se ha demostrado su patogenicidad en bivalvos (Jeffries 1982, Riquelme y col. 1996, Waechter y col. 2002).

Los resultados de esta Memoria resaltan la presencia de posibles nuevas especies de *Vibrio* no descritas. Claramente la diversidad genómica y microevolución de los vibrios requieren una continua investigación para entender el papel ecológico de estas bacterias en el medio acuático y sus posibles efectos patogénicos en almejas y en otros moluscos de importante valor comercial.

## **VIII. CONCLUSIONES**

### 8. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo se pueden deducir las siguientes conclusiones:

1. La carga bacteriana asociada a la almeja (*R. decussatus* y *R. philippinarum*) fue mayor en verano y principios de otoño. Dependiendo de la época del año los valores oscilaron entre  $10^7$  y  $10^5$  UFC/g de tejido de bacterias heterotróficas totales y entre  $10^5$  y  $10^3$  UFC/g de tejido de bacterias del género *Vibrio*.
2. El estudio de la caracterización bioquímica y fisiológica de cepas del género *Vibrio* asociadas a almejas cultivadas permitió una identificación preliminar a nivel de especie, agrupando los aislados en distintos fenones según sus perfiles fenotípicos.
3. La caracterización molecular de los vibrios mediante la técnica de AFLP permitió:
  - a) Una identificación fiable a nivel de especie, evidenciando la presencia de diversidad intraespecífica en algunos taxones.
  - b) Esclarecer la identificación de aislados enmascarados en el fenón de *V. splendidus*. Se demostró que las pruebas bioquímicas realizadas no fueron suficientes o adecuadas para distinguir algunas especies, haciendo necesario recurrir a un sistema de clasificación e identificación bacteriana basado en datos genéticos.
4. Los datos de la técnica de análisis de secuencias multilocus (MLSA) demostraron la utilidad de la secuenciación de genes “housekeeping” para diferenciar entre especies de *Vibrio*, revelando la existencia de 8 posibles nuevas especies dentro de la familia *Vibrionaceae*.

5. No se ha encontrado un único gen que logre diferenciar bien entre todas las especies de *Vibrio*, por tanto la elección de un buen marcador filogenético varía dependiendo del grupo de vibrios estudiado. Un análisis filogenético basado en el concatenado de varios genes ofrece mayor fiabilidad y solidez en la determinación de la posición taxonómica de las especies.

6. El estudio polifásico con resultados fenotípicos y genéticos, permitió la descripción de tres nuevas especies dentro de la Familia *Vibrionaceae*: *Vibrio breoganii* sp. nov., *Vibrio gallaecicus* sp. nov. y *Aliivibrio finisterrae* sp. nov.

7. Los ensayos de infección experimental y caracterización de ECP no permitieron establecer una relación clara y concluyente entre la virulencia de las cepas estudiadas y las actividades enzimáticas y citotóxicas de los productos extracelulares. Son necesarios más estudios para conocer realmente el proceso de desarrollo de la vibriosis en almejas y establecer un modelo de interacción patógeno-hospedador.

## **VIII. CONCLUSIONS**

## 8. CONCLUSIONS

From the results obtained throughout this study, the following main conclusions have been reached:

1. Bacterial populations associated with cultured clams (*R. decussatus* and *R. philippinarum*) were more abundant during summer and early autumn. Depending on the season, bacterial density values oscillated between  $10^7$  and  $10^5$  CFU/g of clam tissue of cultivable heterotrophic bacteria and between  $10^5$  and  $10^3$  CFU/g of clam tissue of facultative anaerobic *Vibrio* isolates.

2. The biochemical and physiological characterization of *Vibrio* strains associated to cultured clams permitted a preliminary identification to species level, grouping the isolates in phenons according to their phenotypic profiles.

3. AFLP molecular characterization of the *Vibrio* isolates permitted:

- a) A reliable identification to species level, demonstrating the presence of intraspecific diversity within some taxa.
- b) The identification of many isolates masked in the phenotypic group of *V. splendidus*. This revealed that the phenotypic tests performed were not sufficient or were inadequate for the identification of some species. Therefore, it is considered necessary a classification and identification system based on genetic data.

4. Results on the multilocus sequence data analysis (MLSA) demonstrated the ability of sequencing housekeeping genes for the differentiation of *Vibrio* species, revealing the existence of 8 possible new species in the Family *Vibrionaceae*.

5. No single gene has been found to clearly delineate all *Vibrio* species; the selection of a good phylogenetic marker will depend on the group of vibrios studied. A phylogenetic analyses based on concatenated genes offers greater reliability in the determination of a species taxonomic position.

6. The polyphasic study based on phenotypic and genetic data permitted the description of three new species in the Family *Vibrionaceae*: *Vibrio breoganii* sp. nov., *Vibrio gallaecicus* sp. nov. and *Aliivibrio finisterrae* sp. nov.

7. After the characterization of the extracellular products (ECP) and infection assays, no clear relationship could be established between virulence of the strains studied and enzymatic and citotoxic activities of the ECP. Further studies are required to understand *Vibrio* pathogenicity in cultured clams and be able to establish a host-pathogen interaction model.





## **IX. BIBLIOGRAFÍA**

## **IX. REFERENCES**

## 9. BIBLIOGRAFIA

- Abollo, E., Casas, S. M., Ceschia, G. y Villalba, A. (2006). Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. *Mol Cell Probes* 20, 323-329.
- Allam, B., Ashton-Alcox, A. y Ford, S. E. (2001). Hemocyte activities associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. clams. *Dev Comp Immunol* 25, 365-375.
- Allam, B. y Ford, S. E. (2006). Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following in vitro challenge. *Fish Shellfish Immunol* 20, 374-383.
- Alsina, M. y Blanch, A. R. (1994). A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J Appl Bacteriol* 76, 79-85.
- Amako, K. y Dales, S. (1967). Cytopathology of mengovirus infection. II. Proliferation of membranous cisternae. *Virology* 32, 201-215.
- Andrews, J. D. (1966). Oyster mortality studies in Virginia. V. Epizootiology of MSX, a protistan pathogen of oysters. *Ecology* 47, 19-31.
- Arias C.R., Verdonck L., Swings J., Aznar R. y Garay E. (1997). Intraspecific differentiation of *Vibrio vulnificus* biotypes by amplified fragment length polymorphism and ribotyping. *Appl Environ Microbiol* 63, 2600-2606.
- Arias, C. R., Macián, M. C., Aznar, R., Garay, E. y Pujalte, M. J. (1999). Low incidence of *Vibrio vulnificus* among *Vibrio* isolates from sea water and shellfish of the western Mediterranean coast. *J Appl Microbiol* 86, 125-134.
- Arzul, I., Renault, T. y Lipart, C. (2001). Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves: demonstration of interspecies transmission. *Dis Aquat Org* 46, 1-6.
- Arzul, I., Renault, T., Thébault, A y Gérard, A. (2002). Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Research* 84, 151-160.

- Aufret, M. y Poder, M. (1986). Sarcomatous lesion in the cockle *Cerastoderma edule*. II. Electron microscopy study. *Aquaculture* 58, 9-15.
- Austin B., Austin D.A., Blanch A.R., Cerda M., Grimont P.A.D., Jofre J., Koblavi S., Larsen J.L., Pedersen K., Tiainen T., Verdonk L. y Swings J. (1997). A comparison of methods for the typing of fish pathogenic *Vibrio* spp. *Syst Appl Microbiol* 20, 80-101.
- Austin, B. y Austin, D. A. (1999). *Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish*, 3º ed. Springer- Verlag KG, Berlin, Alemania.
- Azevedo, C. (1989). Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) under various environmental conditions. *J Shellfish Res* 14, 469-475.
- Azevedo, C., Montes, J. y Corral, L. (1999). A revised description of *Haplosporidium armoricanum*, parasite of *Ostrea edulis* L. from Galicia, northwestern Spain, with special reference to the spore-wall filaments. *Parasitol Res* 85, 977-983.
- Baffone, W., Pianetti, A., Bruscolini, F., Barbieri, E. y Cittero, B. (2000). Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products. *Int J Food Microbiol* 54, 9-18.
- Balboa, S., Ferguson, H. W. y Romalde, J. L. (2007). Phenotypic, serological and genetic characterization of *Pseudomonas anguilliseptica* strains isolated from cod, *Gadus morhua* L., in northern Europe. *J Fish Dis* 30, 657-664.
- Balebona, M. C., Andreu, M., Bordas, M. A., Zorrilla, I., Moriñigo, M. A. y Borrego, J. J. (1998). Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Appl Environ Microbiol* 64, 71-78.
- Balouet, G. (1979). *Marteilia refrigens*. Considerations of the life cycle and development of Aber disease in *Ostrea edulis*. *Mar Fishery Rev* 41, 64-66.
- Balouet, G., Poder, M. y Cahour, A. (1983). Haemocytic parasitosis: Morphology and pathology of lesions in the French flat oyster, *Ostrea edulis* L. *Aquaculture* 34, 1-14.
- Barber, B. J. (2004). Neoplastic diseases of commercially important marine bivalves. *Aquat Living Res* 17, 449-466.
- Bartlett, D. H. (2006).** Extremophilic *Vibrionaceae*. In *The Biology of Vibrios*, pp. 156-171. Edited by F. L. Thompson, B. Austin & J. Swings. Washington: ASM Press.

## ***Bibliografía***

---

- Baumann, S. S. y Baumann, P. (1977). Biology of the marine enterobacteria: genera *Beneckea* and *Photobacterium*. *Annu Rev Microbiol* 31, 39-61.
- Baumann, P., Baumann, L., Bang. S. S. y Woolkalis, M. J. (1980). Reevaluation of the Taxonomy of *Vibrio*, *Beneckea*, and *Photobacterium*: Abolition of the Genus *Beneckea*. *Current Microbiol* 4, 127-132.
- Baumann, P. y Schubert, R. H. (1984). Vibrionaceae. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Editado por N. R. Krieg y J. G. Holt. Williams & Wilkins, Baltimore. pp.516- 550.
- Baumann, P., Furniss, A. L. y Lee, J. L. (1984). Genus I: *Vibrio*. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1º ed, Vol I. Editado por N. R. Krieg y J. G. Holt. Williams & Wilkins Co, Baltimore. pp. 518-538.
- Beaz-Hidalgo R., Cleenwerck I., Balboa S., De Wachter M., Thompson F. L., Swings J., De Vos P. y Romalde J. L. (2008).** Diversity of *Vibrios* associated with reared clams in Galicia (NW Spain). *Syst Appl Microbiol* 31, 215-222.
- Béjar, J., Porta, J., Borrego, J. J. y Álvarez, M. C. (2005).** The piscine SAF-1 cell line: genetic stability and labeling. *Mar Biotechnol* 7, 389-395.
- Benediktsdottir, E., Helgason, S. y Sigurjonsdottir, H. (1998).** *Vibrio* spp. isolated from salmonids with shallow skin lesions and reared at low temperature. *J Fish Dis* 21, 19-28.
- Benediktsdottir, E., Verdonk L., Sproer, C., Helgason, S. y Swings, J. (2000). Characterization of *Vibrio viscosus* and *Vibrio wodanis* isolated at different geographical locations: a proposal for reclassification of *Vibrio viscosus* as *Moritella viscosa* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 479-488.
- Ben-Haim, Y., Thompson, F. L., Thompson, C. C., Cnockaert, M. C., Hoste, B., Swings, J. y Rosenberg, E. (2003). *Vibrio coralliluticus* sp. nov., a temperatura dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Int J Syst Appl Microbiol* 53, 309-315.

- Bennasar, A., de Luna, G., Cabrer, B. y Lalucat, J. (2000). Rapid identification of *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis* and *S. virchow* isolates by polymerase chain reaction based fingerprinting methods. *Int Microbiol* 3, 31-38.
- Berthe, F. C. J., Le Roux, F., Peyretailade, E., Peyret, P., Rodríguez, D., Gouy, M. y Vivarès, C. P. (2000). Phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA of *Marteilia refrigens* validates the existence of Phylum Paramyxia (Desportes and Perkins, 1990). *J Eukaryotic Microbiol* 47, 288-293.
- Biosca, E. y Amaro, C. (1996). Toxic and enzymatic activities of *Vibrio vulnificus* biotype 2 with respect to host specificity. *Appl Environ Microbiol* 62, 2331-2337.
- Blackbourn, J., Bower, S. M. y Meyer, G. R. (1998). *Perkinsus qugwadi* sp. nov. (incertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. *Can J Zool* 76, 942-953.
- Boettcher, K. J., Barber, B. J. y Singer, J. T. (1999).** Use of antibacterial agents to elucidate the etiology of juvenile oyster disease (JOD) in *Crassostrea virginica* and numerical dominance of an  $\alpha$ -Proteobacterium in JOD-affected animals. *Appl Environ Microbiol* 65, 2534-2539.
- Boettcher, K. J., Barber B. J. y Singer, J. T. (2000).** Additional evidence that juvenile oyster disease is caused by a member of the *Roseobacter* group and colonization of nonaffected animals by *Stappia stellulata*-like strains. *Appl Environ Microbiol* 66, 3924-3930.
- Boettcher, K. J., Gheaghan, K. K., Maloy, A. P. y Barber, J. B. (2005). *Roseovarius crassostreae* sp. nov., a member of the *Roseobacter* clade and the apparent cause of juvenile oyster disease (JOD) in cultured Eastern oysters. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 1531-1537.
- Boardman, C. L., Maloy, A. y Boettcher, K. (2008). Localization of the bacterial agent juvenile oyster disease (*Roseovarius crassostreae*) within affected eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *J Invert Pathol* 97, 150-158.
- Borrego, J. J., Castro, D., Luque, A., Paillard, C., Maes, P., García, M. y Ventosa, A. (1996). *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *Int J Syst Bacteriol* 46, 480-484.

- Bower, S. M., McGladdery, S. E., y Price, I. M. (1994). Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Annu Rev Fish Dis* 4, 1-199.
- Brehelin, M., Bonami, J. R., Cousserans, F. y Vivares, C. (1982). Existences de formes plasmodiales varies chez *Bonamia ostreae* parasite de l'hôte plate *Ostrea edulis*. *C R Acad Sci Paris*, 45-48.
- Bricelj, V. M., Ford S. E., Borrero, F. J., Perkins, F. O., Rivara, G. **Hillman, R. E., Elston, R. A. y Chang, J.** (1992). Unexplained mortalities of hatchery-reared juvenile oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J Shellfish Res* 11, 331-347.
- Brown, C. (1974).** A pigment-producing *Pseudomonad* which discolors culture containers of embryos of a bivalve mollusk. *Chesapeake Sci* 15, 17-21.
- Brown, C. (1981).** A prodiginine pigment toxic to embryos and larvae of *Crassostrea virginica*. *J Invertebr Pathol* 38, 281-293.
- Brown, C. (1983).** Bacterial diseases in bivalve larval cultures and their control, pp. 230-242 en *Culture of marine invertebrates*, editado por Carl J. Berg, jr. Hutchinson Ross Publishing Company, Stroudsburg, Pennsylvania.
- Brown, C., Blogoslawski, W. y Tettelbach, L. P. (1988). Enumeration and identification of heterotrophic bacteria on oyster grounds of Long Island Sound. *J Shellfish Res* 7, 479-482.
- Brown, C. y Losee, E. (1978). Observations on natural and induced epizootics of vibriosis in *Crassostrea virginica* larvae. *J Invertebr Pathol* 31, 41-47.
- Brun, N. T., Ross, N. W. y Bogen, A. D. (2000). Changes in the electrophoretic profiles of gill mucus proteases of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in response to infection by the turbellarian *Urastoma cyprinae*. *J Invert Pathol* 75, 163-170.
- Buck, J.D. (1982). Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* 44, 992-993.
- Burreson, E. M., Reece, K. S., y Dungan, C. F. (2005). Molecular, morphological, and experimental evidence support the synonymy of *Perkinsus chesapeaki* and *Perkinsus andrewsi*. *J Eukaryot Microbiol* 52, 258-270.

- Burreson, E. M., Stokes, N. A. y Friedman, C. S. (2000). Increased virulence in an introduced pathogen: *Haplosporidium nelsoni* in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *J Aquat Anim Health* 12, 1-8.
- Byoung-Kwon, H., Maldonado, Y., Schreiber, E., Bhunia, A. K. y Nakatsu, C. H. (2003). Subtyping of foodborne and environmental isolates of *Escherichia coli* by multiplex-PCR, rep-PCR, PFGE, ribotyping and AFLP. *J Microbiol Methods* 53, 387-399.
- Cajaraville, M. P. y Angulo E. (1991). Chlamydia-like organisms in digestive and duct cells of mussels from the Basque coast. *J Invertebr Pathol* 58, 381-386.
- Carballal, M. J., Villalba, A. e Iglesias, D. (2003). Virus-like particles associated with large foci of heavy hemocytic infiltration in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (NW Spain). *J Invert Pathol* 84, 234-237.
- Carnegie, R. B., Barber, B. J. y Distel, D. L. (2003). Detection of the oyster parasite *Bonamia ostreae* by fluorescent in situ hybridization. *Dis Aquat Org* 55, 247-252.
- Carrasco, N., Arzul, I., Berthe, F. C. J., Fernández-Tejedor, M., Durfort, M. y Furones, M. D. (2008). Delta de l'Ebre is a natural bay model for *Marteilia* spp. (Paramyxia) dynamics and life cycle studies. *Dis Aquat Org* 79, 65-79.
- Casas, S. M., La Peyre, J. F., Reece, K. S., Azevedo, C., y Villalba, A. (2002). Continuous in vitro culture of the carpet-shell clam *Tapes decussatus* protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. *Dis Aquat Org* 52, 217-231.
- Casas, S. M., Grau, A., Reece, K. S., Apakupakul, K., Azevedo, C. y Villalba, A. (2004). *Perkinsus mediterraneus* n. sp., a protistan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis* from the Balearic Islands, Mediterranean Sea. *Dis Aquat Org* 58, 231-244.
- Castro, D., Luque, A., Santamaria, J.A., Maes, P., Martinez-Manzanares, E. y Borrego, J.J. (1995). Development of immunological techniques for the detection of the potential causative agent of the brown ring disease. *Aquaculture* 132, 97-104.
- Castro, D., Moriñigo, M. A., Cornax, R., Balebona, M. C. y Borrego, J. J. (1990). Detection of potentially pathogenic bacteria in semi-intensive culture of flat clams (*Tapes semidecussatus*) from southwest Spain. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 10, 50-52.

- Castro, D., Martínez-Manzanares, E., Luque, A., Fouz, B., Moriñigo, M.A. y Borrego, J.J. (1992). Characterization of strains related to brown ring disease outbreaks in Southwestern Spain. *Dis Aquat Org*, 14, 229-236.
- Castro, D., Pujalte, M. J., Lopez-Cortes, L. Garay, E. y Borrego, J. J. (2002). *Vibrios* isolated from the cultured manila clam (*Ruditapes philippinarum*): numerical taxonomy and antibacterial activities. *J Appl Microbiol* 93, 438-447.
- Ceschia, G., Zanchetta, S., Sello, M., Montesi, F. y Figueras, A. (2001). Presenza di parassiti in cannolichi (*Ensis minor* and *Ensis siliqua*) pescati nell'area costiera del Mar Tirreno meridionale e del Mar Adriatico. *Bol Soc Ital Patol Ittica* 13, 20-27.
- Cleenwerck, I., Vandemeulebroecke, K., Janssens, D. y Swings, J. (2002). Re-examination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 1551-1558.
- Cochennec, N., Le Roux, F., Berthe, F. y Gerard A. (2000). Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *J Invert Pathol* 76, 26-32.
- Collins, C. M. y Mulcahy, M. F. (2003). Cell- free transmission of a haemic neoplasm in the cockle *Cerastoderma edule*. *Dis Aquat Org* 54, 61-67.
- Colquhoun, D. J. y Sørum, H. (2001).** Temperature dependent siderophore production in *Vibrio salmonicida*. *Microb Pathog* **31**, 213-219.
- Colquhoun, D. J., Alvheim, K., Dommarsnes, K., Syvertsen, C. y Sørum, H. (2002).** Relevance of incubation temperature for *Vibrio salmonicida* vaccine production. *J Appl Microbiol* **92**, 1087-1096.
- Colwell, R. R. (1970). Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J Bacteriol* 104, 410-413.
- Colwell, R. R. y Liston, J. (1961). A bacteriological study of the natural flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) when transplanted to various areas in Washinton. *Proc Nat Shellfish Assoc* 181-188.
- Colwell, R. R. y Sparks, K. (1967). Properties of *Pseudomonas* enalia, a marinebacterium pathogenic for the invertebrate *Crassostrea gigas*. *Appl Microbiol* 15, 980-986.



- Comps, M. y Cochenenec, N. (1993). A herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis*. *J Invert Pathol* 62, 201-203.
- Coss, C. A., Robledo, J. A. F., Ruiz, G. M. y Vasta, G. R. (2001). Description of *Perkinsus andrewsi* n. sp. isolated from the Baltic clam (*Malcoma balthica*) by characterization of the ribosomal RNA locus, and development of a species-specific PCR-based diagnostic assay. *J Eukaryot Microbiol* 48, 52-61.
- Cox, M. M. (2003). Bacterial RecA protein as a motor protein. *Annu Rev Microbiol* 57, 551-577.
- Culloty, S. C., Cronin, M. A. y Mulcahy, M. F. (2004). Potential resistance of a number of populations of the oyster *Ostrea edulis* to the parasite *Bonamia ostreae*. *Aquaculture* 237, 41-58.
- Davis, C. V. y Barber, B. J. (1994). Size-dependent mortality in hatchery-reared populations of oysters, *Crassostrea virginica*, Gmelin 1791, affected by juvenile oyster disease. *J Shellfish Res* 13, 137-142.
- de Bruijn, F. J. (1992). Use of Repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) sequences and the Polymerase Chain Reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 58, 2180-2187.
- de la Herrán, R., Garrido- Ramos, M. A., Navas, J. I., Ruiz Rejón, C., y Ruiz Rejón, M. (2000). Molecular characterization of the ribosomal RNA gene region of *Perkinsus atlanticus*: its use in phylogenetic analysis and as a target for a molecular diagnosis. *Parasitology* 120, 345-353.
- Dieckman, R., Graeber, I., Kaesler, I., Szewzyk, U. y von Dohren, H. (2005). Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the Sula Ridge by intact-cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS). *Appl Microbiol Biotechnol* 67, 539.
- Dice, R. L. (1945). Measures of amount of ecological association between species. *Ecology* 26, 297-302.

Dickinson, D. N., La Duc, M. T., Haskins, W. E., Gornushkin, I., Winefordner, J. D., Powell, D. H. y Venkateswaran, K. (2004). Species differentiation of a diverse suite of *Bacillus* spores by Mass Spectrometry-based Protein Profiling. *Appl Environ Microbiol* 70, 475-482.

**Di Salvo, L. H., Blecka, J. y Zebal, R. (1978).** *Vibrio anguillarum* and larval mortality in a California coastal shellfish hatchery. *Appl Environ Microbiol* 35, 219-221.

Dorsch, M., Lane, D. y Stackebrandt, E. (1992). Towards a phylogeny of the genus *Vibrio* based on 16S rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol* 42, 58-63.

Dungan, C. F., Elston, R. y Schiewe, M. (1989). Evidence for colonization and destruction of hinge ligaments in cultured juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) by Cytophaga-Like bacteria. *Appl Environ Microbiol* 55, 1128-1135.

Duim, B., Vandamme, P. A. R., Rigter, A., Leevens, S., Dijkstra, J. R. y Wagenaar, J. (2001). Differentiation of *Campylobacter* species by AFLP fingerprinting. *Microbiology* 147, 2729-2737.

**Egidius, E., Andersen, K., Causen, E. y Raa, J. (1981).** Cold water vibriosis or “Hitra disease” in Norwegian salmonid farming. *J Fish Dis* 4, 353-354.

**Egidius, E., Wiik, R., Andersen, K., Hoff, K. A. y Hjeltne, B. (1986).** *Vibrio salmonicida* sp. nov., a new fish pathogen. *Int J Syst Bacteriol* 36, 518-520.

**Elston, R. (1984).** Prevention and management of infectious diseases in intensive mollusc husbandry. *J World Maricul Soc* 15, 284-300.

**Elston, R. y Leibovitz L. (1980).** Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*. *Can J Fish Aquat Sci* 37, 964-978.

**Elston, R. y Lockwood, G. S. (1983).** Pathogenesis of vibriosis in cultured juvenile red abalone *Haliotis rufescens*, Swainson. *J Fish Dis* 6, 111-128.

**Elston, R., Elliot, E. L. y Colwell, R. R. (1982).** Conchiolin infection and surface coating *Vibrio*: shell fragility, growth depression and mortalities in cultured oysters and clams, *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* and *Mercenaria mercenaria*. *J Fish Dis* 5, 265-284.

- Ezaki, T., Hashimoto, Y. y Yabuuchi, E. (1989). Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridisation in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridisation in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* 39, 224–229.
- Farley, C. A. (1969). Probable neoplastic disease of the hematopoietic system in oysters, *Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*. *Natl Cancer Inst Monogr* 31, 541-555.
- Farmer, J. (1992). The Family Vibrionaceae. In Ballows A., Truper, H. G., Dworkin M., Harder, W. y Schleifer, K. H. (eds). *The Prokariotes Second Edition. A Handbook on the Biology of Bacteris: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Springer-Verlag, pp. 2938-3011.
- Farmer, J. J. III y Hickman-Brenner, F. W. (1992). The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. En *The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, 2º ed. Vol III. Editado por A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder y K. H. Schleifer. Springer. Verlag, New York. pp. 2952-3011.
- Farto, R., Armada, S. P., Montes, M., Guisande, J. A., Pérez, M. J. y Nieto, T. P. (2003). *Vibrio lentus* associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*). *J Invert Pathol* 83, 149-156.
- Farto, R., Guisande, J. A., Armada, S. P., Prado, S. y Nieto, T. P. (2006). An improved and rapid biochemical identification of indigenous aerobic culturable bacteria associated with Galician oyster production. *J Shellfish Res* 25, 1059-1065.
- Farto, R., Pérez, M. J., Fernández-Briera, A. y Nieto, T. P. (2002). Purification and partial characterization of a fish lethal extracellular protease from *Vibrio pelagius*. *Veterinary microbiology* 89, 181-194.
- Faury, N., Saulnier, D., Thompson, F.L., Gay, M., Swings, J. y Le Roux, F. (2004). *Vibrio crassostreae* sp. nov. isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*). *Int J Sys Evol Microbiol* 54, 2137-2140.
- Feil, E. J. (2004). Small change: keeping pace with microevolution. *Nat Rev Microbiol* 12, 483-495.

**Fidopiastis, P. M., von Boletzky, S. y Ruby, E. G. (1998).** A new niche for *Vibrio logei*, the predominant light organ symbiont of squids in the genus *Sepiola*. *J Bacteriol* **180**, 59-64.

Figueras, A., Robledo, J.A.F. y Novoa, B. (1992). Occurrence of *Haplosporidium* and *Perkinsus*-like infections in carpet-shell clams, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) of the Ría of Vigo (Galicia, NW Spain). *J Shell Res* **11**, 377-382.

Figueras, A., Robledo, J. A. F. y Novoa, B. (1996). Brown ring disease and parasites in clams (*Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*) from Spain and Portugal. *J Shellfish Res* **15**, 363-368.

Ford, S. E. y Borrero F. J. (2001). Epizootiology and pathology of juvenile oyster disease in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J Invertebr Pathol* **78**, 141-154.

Fouz, B. R. (1993). Caracterización de *Vibrio damsela*: Nuevo agente patógeno en acuicultura marina. Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela.

Friedman C. S., Beattie, J. H., Elston, R. A. y Hedrick, R. P. (1991). Investigation of the relationship between the presence of a Gram-positive bacterial infection and summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Aquaculture* **94**, 1-15.

Friedman, C. S., Beaman, B. L., Chun J., Goodfellow, M., GEE A. et al. (1998) *Nocardia crassostreae* sp. nov., the casual agent of nocardiosis in Pacific oysters. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 237-246.

Friedman, C. S. y Hedrick, R. P. (1991). Pacific oyster nocardiosis: Isolation of the bacterium and induction of laboratory infections. *J Invertebr Pathol* **57**, 109-120.

Fries, C. R. y Grant, D. M. (1991). Rickettsiae in gill epithelial cells of the hard clam *Mercenaria mercenaria*. *J Invertebr Pathol* **57**, 166-171.

Garland, C. D., Nash, G. V. y McMeekin, T. A. (1982). Absence of surface-associated microorganisms in adult oysters (*Crassostrea gigas*). *Appl Environ Microbiol* **44**, 1205-1211.

- Garland, C. D., Nash, G. V., Sumner, C. E. y McMeekin, T. A. (1983).** Bacterial pathogens of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in a Tasmanian hatchery. *Aust J Mar Fresw Res* **34**, 483-487.
- Garnier, M., Labreuche, Y., García, C., Robert, M. y Nicolas, J. L. (2007). Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microb Ecol* **53**, 187-196.
- Gay, M., Renault, T., Pons, A. M. y Le Roux, F. (2004a). Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Dis Aquat Org* **62**, 65-74.
- Gay, M., Berthe, F. C. J. y Le Roux F. (2004b). Screening of vibrio isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis Aquat Org* **59**, 49-56.
- Gee, A. y Elston, R. A. (1997). PCR detection of the bacterial pathogen in oyster nocardiosis. *J Shellfish Res* **16**, 264.
- Goggin, C. L. y Baker, S. C. (1993). Phylogenetic position of the genus *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa) based on small subunit ribosomal RNA. *Mol Biochem Parasitol* **60**, 65-70.
- Gómez-Gil, B., Soto-Rodríguez, S., García-Gasca, A., Roque, A., Vazquez-Juarez, A. y Swings, J. (2004). Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology* **150**, 1769-1777.
- Gomez-Gil, B., Thompson, F. L., Thompson, C. C. y Swings, J. (2003). *Vibrio rotiferienus* sp. nov. isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 239-243.
- Gómez-León, J., Villamil, L., Lemos, M. L. y Novoa, B. (2005). Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Appl Environ Microbiol* **71**, 98-104.
- Gómez-León, J., Villamil, L., Salger, S. A., Sallum, R. H., Remacha-Triviño, A., Leavitt, D. F. y Gómez-Chiarri, M. (2008). Survival of eastern oysters *Crassostrea*

virginica from three lines following experimental challenge with bacterial pathogens. *Dis Aquat Org* 79, 95-105.

Goris, J., Suzuki, K., De Vos, P., Nakase, T. y Kersters, K. (1998). Evaluation of a microplate DNA-DNA hybridization method compared with the initial renaturation method. *Can J Microbiol* 44, 1148-1153.

Graf, J. y Ruby, E.G. (2000). Novel effects of a transposon insertion in the *Vibrio fischeri* *glnD* gene: defects in iron uptake and symbiotic persistence in addition to nitrogen utilization. *Mol Microbiol* 37, 168-179.

Grizel, H., Comps, M., Bkonami, J. R., Cousserans, F., Duthoit, J. L. y Le Pennec, M. A. (1974). Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. *Sci Pêche* 240, 7-29.

Guerinot, M. L. y Patriquin, D. G. (1981). N<sub>2</sub>-fixing vibrios isolated from the gastrointestinal-tract of sea urchins. *Can J Microbiol* 27, 311-317.

**Guillard, R. R. L. (1959).** Further evidence of the destruction of bivalve larvae by Bacteria. *Biol Bull* 117: 258-266, 1959.

Guisande, J. A., Montes, M., Farto, R., Armada, S. P., Pérez, M. J. y Nieto T. P. (2004). A set of tests for the phenotypic identification of culturable bacteria associated with Galician bivalve mollusk production. *J Shellfish Res* 23, 599-610.

Gulka, G., Chang, P. W. y Martik, A. (1983). Prokaryotic infection associated with a mass mortality of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *J Fish Dis* 6, 355-364.

Hada, H. S., West, P. A., Lee, J. V., Stemmler J. y Colwell R. R. (1984). *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve mollusks. *Intern J System Bacteriol* 34, 1-4.

Hariharan, H., Giles, J. S., Heaney, S. B., Arsenault, G., McNair, N. y Rainnie, D. J. (1995). Bacteriological studies on mussels and oysters from six river systems in Prince Edward Island, Canada. *J Shellfish Res* 14, 527-532.

Harshbarger, J. C. y Chang, S. C. (1977). Chlamydiae (with phages), mycoplasmas, and rickettsiae in Chesapeake Bay bivalves. *Science* 196, 666-668.

Hayashi, K., Moriwaki, J., Sawabe, T., Thompson, F.L., Swings, J., Gudkovs, N., Christen, R. y Ezura, Y. (2003). *Vibrio superstes* sp. nov., isolated from the gut of

- Australian abalones *Haliotis laevis* and *Haliotis rubra*. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 1813-1817.
- Hazañas, M., Carrasco, M. I., Castro, D., García-Casado, J. L., Cornax, R., Martínez-Manzanares, E. y Borrego, J. J. (1990). Estudio de la infección experimental de *Tapes decussatus* por cepas de *Vibrio alginolyticus* aisladas de brotes epizooticos. *Actas III Congreso Nac Acuicult*, 903-908.
- Hedlund, B. P. y Staley, J. T. (2001). *Vibrio cyclotrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)- degrading marine bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 61-66.
- Hine, P. M., y Diggles, B. K. (2002). Prokaryote infections in the New Zealand scallops *Pecten novaezelandiae* and *Chlamys delicatula*. *Dis Aquat Org* 50, 137-144.
- Hine, P.M. y Wesney, B. (1997). Virus-like particles associated with cytopathology in the digestive gland epithelium of scallops *Pecten novaezelandiae* and toheroa *Paphies ventricosum*. *Dis Aquat Org* 29, 197-204.
- Hine, P. M., Wesney, B. y Hay, B. E. (1992). Herpesvirus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Dis Aquat Org* 12, 135-142.
- House, M. L., Kim, C.H. y Reno, P.W. (1998). Soft shell clams *Mya arenaria* with disseminated neoplasia demonstrate reverse transcriptase activity. *Dis Aquat Org* 34, 187-192.
- Hulton, C. S. J., Higgins, C. F. y Sharp, P. M. (1991). ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other bacteria. *Mol Microbiol* 5, 825-834.
- Hutson, R. A., Thompson, D. E. y Collins, M. D. (1993). Genetic interrelationship of saccharolytic *Clostridium botulinum* types B, E and F and related clostridia as revealed by small-sub-unit rRNA gene sequences. *FEMS Microbiol Lett* 108, 103-110.
- Huys, G., Coopman, R., Janssen, P. y Kersters, K. (1996). High-resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol* 46, 572-580.

Huys, G. y Swings, J. (1999). Evaluation of a fluorescent amplified fragment length polymorphism methodology for the genotypic discrimination of *Aeromonas* taxa. FEMS Microbiol Lett 177, 83-92.

JACUMAR / MAPYA [http://www.mapa.es/es/pesca/pags/jacumar/presentacion/acuicultura\\_es.htm](http://www.mapa.es/es/pesca/pags/jacumar/presentacion/acuicultura_es.htm)

Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos P., Zabeau, M. y Kersters, K. (1996). Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. Microbiology 142, 1881-1893.

Jensen, S., Samuelsen, O. B., Andersen, K., Torkildsen, L., Lambert, C., Choquet, G., Paillard, C. y Berg, O. (2003). Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *V. tapetis* isolated from corwing wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis. Dis Aquat Org 53, 25-31.

Jeffries, V. E. 1982. Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. Aquaculture 29, 201-226.

Jiang, S. C., Louis, V., Choopun, N., Sharma, A., Huq, A. y Colwell, R. (2000). Genetic diversity of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay determined by Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting. Appl Environ Microbiol 66, 140-147.

Jorquera M. A., Silva, F. R. y Riquelme, C. E. (2001). Bacteria in the culture of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Aquaculture International 9, 285-303.

Khan, A., McCarthy S., Wang, R. F. y Cerniglia C. E. (2002). Characterization of United State outbreak isolates of *Vibrio parahaemolyticus* using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR and development of a rapid PCR method for detection of O3:K6 isolates. FEMS Microbiol Lett 206, 209-214.

Keto-Timonen, R., Heikinheimo, A., Enrola, E. y Korkeala, H. (2006). Identification of *Clostridium* species and DNA fingerprinting of *Clostridium perfringens* by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis. J Clin Microbiol 44, 4057-4065.

Kita-Tsukamoto, K., Oyaizo, H., Nanba, K. y Simidu, U. (1993). Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family Vibrionaceae, determined on the basis of 16S rRNA sequences. Int J Syst Bacteriol 43, 8-19.



- Kleeman, S. N., Le Roux, F., Berthe, F. y Adlard, R. D. (2002). Specificity of PCR and in situ hybridization assays designed for detection of *Marteilia sydneyi* and *M. refrigens*. *Parasitology* 125, 131-141.
- Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyogenes* by the oxidase reactions. *Nature* 178, 703.
- Kueh, C. S. W. y Chan, K. Y. (1985). Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. *J Appl Bacteriol* 59, 41-47.
- Kumar N. R. y Nair S. (2007). *Vibrio rhizospaerae* sp. nov., a red pigmented bacterium that antagonizes phytopathogenic bacteria. *Int J Syst Evol. Microbiol* 57, 2241-2246.
- Lee, K. K., Yu, S. R. y Liu, P. C. (1997). Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in Kuruma prawn, *Penaeus jeponicus*. *Current Microbiol* 34, 110-117.
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gelebart, F., Cordevant, C., Lange, M. y Poulet, S. A. (2001a). A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis Aquat Org* 46, 139-145.
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A. y Poulet, S. A. (2001b). Stress and stress- induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Appl Environ Microbiol* 67, 2304- 2309.
- Lambert C., Nicolas J.L., Cilia V. y Corre S. (1998).** *Vibrio pectenica* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 481-487.
- Lambert, C., Nicolas, J. L. y Bultel, V. (2001). Toxicity to bivalve hemocytes of pathogenic *Vibrio* cytoplasmic extract. *J Invert Pathol* 77, 165-172.
- Lan, R. y Reeves, P. R. (2002). Pandemic spread of cholera: genetic diversity and relationships within the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae* determined by amplified fragment length polymorphis. *J Clin Microbiol* 40, 172-181.
- Laubreche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A. y Nicolas, J. L. (2006). Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes Infect* 8, 2715-2724.

## ***Bibliografía***

---

Lavilla-Pitogo, C. R. y de la Pena, L. D. (1998). Mortalities of pond- cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominante of luminiscent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture* 164, 337- 349.

Leano, E. M., Lavilla- Pitogo, C. R. y Paner, M. G. (1998). Bacterial flora in the hepatopancreas of pond reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous vibriosis. *Aquaculture* 164, 367-374.

Lee, K. K., Chen, F. R., Yu, S. R., Yang, T. I. y Liu, P. C. (1997). Effects of extracellular products of *Vibrio alginolyticus* on penaeid prawn components. *Lett Appl Microbiol* 24, 98-100.

**Le Gall, G. y Mialhe, E. (1992).** Purification of Rickettsiales-like organisms associated with *Pecten maximus* (Mollusca: Bivalvia): serological and biochemical characterization. *Dis Aquat Org* 12, 215-220.

**Lemos, M. L., Toranzo, A. E. y Barja, J. L. (1985).** Modified medium for the oxidation-fermentation test in the identification of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* 49, 1541-1543.

Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., Nicolas, J. L. y Berthe, F. C. (2002). Comparative analysis of *Vibrio splendidus* related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquat Living Resources* 15, 251-258.

**Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Nicolas, J. L., Gouy, M. y Berthe, F. C. (2004).** Phylogenetic study and *identification of Vibrio splendidus- related strains on gyrB gene sequences*. *Dis Aquat Organ* 58, 143-150.

**Le Roux, F., Goubet, A., Thompson, F.L., Faury, N., Gay, M., Swings, J. y Saulnier, D. (2005).** *Vibrio gigantis* sp. nov. Isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*). *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2251-2255.

**Le Roux, F., Lorenzo, G., Peyret, P., Audermard, C., Figueras, A., Vivarès, C., Gouy, M. y Berthe, F. C. J. (2001).** Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. *J Euk Microbiol* 48, 449-454.

- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Waetcher, M., Poubalannes, S., **Chollet, B., Nicolas, J. L. y Berthe, F. C. J.** (2002). Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquat Living Resour* **15**, 251-258.
- Lester, R. J. G. y Davis, G. H. G. (1981).** A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber*. *J Invertebr Pathol* **37**, 181-187.
- Lida, Y., Honda, R., Nishihara, M. y Muroga, K. (2000).** Bacterial flora in the digestive tract of cultured Pacific oyster. *Fish Pathology* **35**, 173-177.
- Lipp, P. R., Brown, B. Liston, J. y Chew, K. (1976).** Recent findings on the summer diseases of Pacific oysters. *Proc Nat Shellfish Assoc* **65**, 9-10.
- Liu, P. V. (1957).** Survey of hemolysin production among species of *Pseudomonas*. *J Bacteriol* **74**, 718-727.
- Lodeiros, C., Bolinches, J., Dopazo, C. P. y Toranzo, A. E. (1987).** Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture* **65**, 15-29.
- Lodeiros, C., Freitas, L. Y. y Vélez A. (1992).** Necrosis bacilar en larvas del bivalvo *Euvola ziczac* (Linneo, 1758) causada por una *Pseudomonas* sp. Microbiología, Acta Científica Venezolana **43**, 154-158.
- López, C y Darriba, S. (2006).** Presence of *Marteilia* sp. (Paramyxia) in the razor clam *Solen marginatus* (Pennant, 1777) in Galicia (NW Spain). *J Invert Pathol* **92**, 109-111.
- López-Flores I., de la Herran, R., Garrido-Ramos, M. A., Navas, J. I., Ruiz-Rejón, C. y Ruiz-Rejón, M. (2004).** The molecular diagnosis of *Marteilia refrigens* and differentiation between *Marteilia* strains infecting oysters and mussels based on the rDNA IGS sequence. *Parasitology* **129**, 411-419.
- López-Flores, I., Garrido-Ramos, M. A., de la Herran, R., Ruiz-Rejón, C., Ruiz-Rejón, M. y Navas, J. I. (2008).** Identification of *Marteilia refrigens* infecting the razor clam *Solen marginatus* by PCR and *in situ* hybridization. *Mol Cell Probes* **22**, 151-155.

**Lovelace, T. E., Tubiash, H. y Colwell, R. R. (1968).** Quantitative and qualitative commensal bacterial flora of *Crassostrea virginica* in Chesapeake Bay. *Proc Nat Shellfish Ass* **58**, 82-94.

**Luna-González, A., Maeda-Martínez, A. N., Sáinz, J. C. y Ascencio-Valle F. (2002).** Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to a *Vibrio alginolyticus* strains. *Dis Aquat Org* **49**, 221-226.

**Lunder, T., Evensen, Ø, Holstad, G. y Hastein, T. (1995).** “Winter ulcer” in the Atlantic salmon *Salmo salar*. Pathological and bacteriological investigations and transmission experiments. *Dis Aquat Org* **23**, 39-49.

**Lunder, T., Forum, H., Holstad, G., Steigerwalt, A. G., Mowinckel, P. & Brenner, D. J. (2000).** Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio viscosus* sp. nov. and *Vibrio wodanis* sp. nov. Isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with “winter ulcer”. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 427-450.

**Macián, M. C., Arias, C. R., Aznar, R., Garay, E. y Pujalte, M. J. (2000a).** Identification of *Vibrio* spp. (other than *V. vulnificus*) recovered on CPC agar from marine natural samples. *Internat Microbiol* **3**, 51-53.

**Macián, M.C., Garay, E., Gonzalez- Candelas, F., Pujalte, M. J. y Aznar, R. (2000b).** Ribotyping of vibrio populations associated with cultured oysters (*Ostrea edulis*). *Sys Appl Microbiol* **23**, 409-417.

**Macián, M.C., Ludwig, W., Aznar, R., Grimont, P.A.D., Scleifer, K.H., Garay, E. y Pujalte, M.J. (2001).** *Vibrio lentus* sp. nov., isolated from Mediterranean oysters. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1449-1456.

Mac Faddin, J. F. (1993). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. The William & Wilkins Company. Baltimore. Translation by Médica Panamericana S.A.

Mackin J.G., Owen, H. M. y Collier A. (1950). Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Science* **111**, 328-329.

- Maeda, H. y Yamamoto, T. (1996). Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections. *Biol Chem Hoppe Seyler* 377, 217-226.
- Maes, C. y Paillard, C. (1992). Effect du *Vibrio* P1, pathogène de *Ruditapes philippinarum*, sur d'autres espèces de bivalves. *Les Mollusques marins, Biologie et Aquaculture*. Ifremer, Actes de Colloques 14, 141-148.
- Maloy, A. P., Barber B. J. y Boettcher K. J. (2005).** A PCR-based diagnostic assay for the detection of *Roseovarius crassostreae* in *Crassostrea virginica* affected by juvenile oyster disease (JOD). *Dis Aquat Org* 67, 155-162.
- Maloy, A. P., Ford, S. E., Karney, R. C. y Boettcher, K. J. (2007). *Roseovarius crassostreae*, the etiological agent of Juvenile Oyster Disease (now to be known as *Roseovarius* Oyster Disease) in *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* 269, 71-83.
- Malupin, R. P., Ravelo, C., Lavilla- Pitogo, C. R., Kovacek. K. y Romalde J.L. (2005). Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from the Philippines by PCR-based methods. *J Appl Microbiol* 99, 383-391.
- Mancuso, M., Avendaño-Herrera, R., Zacccone, R., Toranzo, A. E. y Magariños, B. (2007). Evaluation of different DNA-based fingerprinting methods for typing *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Biol Res* 40, 85-92.
- Marshall, D. J. y Day, R. (2001). Change in the rate of shell deposition and shell microstructure in response to shell borers in the abalone *Haliotis rubra*. *Mar Freshwater Behav Physiol* 34, 189-195.
- Martin, A. G., Gerard A., Cochenne, N. y Langlade, A. (1993). Selecting flat oysters, *Ostrea edulis*, for survival against the parasite *Bonamia ostreae*: Assessment of the resistance of a first selected generation. *Eur Aquat Soc Spec Publ* 18, 545-554.
- Martínez-Manzanares, E., Castro, D., Navas, J. I., Lopez-Cortes, M. L. y Borrego, J. J. (1998). Transmission routes and treatment of brown ring disease affecting manila clams (*Tapes philippinarum*). *Journal of Shellfish Research* 17, 1051-1056.
- Maugeri, T. L., Caccamo, D. y Gugliandolo, C. (2000). Potentially pathogenic vibrios in brackish waters and mussels. *J Appl Microbiol* 89, 261-266.
- McHenery, J. G. y Birkbeck, T. H. (1985). Uptake and processing of cultured microorganisms by bivalves. *Journal of Exp Mar Biol Ecol* 90, 145-163.

## ***Bibliografía***

---

- McLaughlin, S. M., Tall, B. D., Shaheen, A., Elsayed, E. E. y Faisal, M. (2000). Zoosporulation of a new Perkinsus species isolated from gills of the softshell clam *Mya arenaria*. *Parasite* 7, 115-122.
- Mellado, E., Moore, E. R. B., Nieto, J. J. y Ventosa, A. (1996). Analysis of 16S rRNA gene sequences of *Vibrio costicola* strains: description of *Salinivibrio costicola* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 46, 817-821.
- Mesbah, M., Premachandran, U. y Whitman, W. B. (1989). Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* 39, 159-167.
- Montes, J., Villalba, A., Lopez, M. C., Carballal, M. J. y Mourelle, S. G. (1991). Bonamiasis in native flat oysters (*Ostrea edulis* L.) from two intertidal beds of the Ortigueira estuary (Galicia, NW. Spain) with different history of dedication to oyster culture. *Aquaculture* 93, 213-224.
- Montes, J. F., Durfort, M. y García-Valero, J. (2001). Parasitism by the protozoan *Perkinsus atlanticus* favours the development of opportunistic infections. *Dis Aquat Org* 46, 57-66.
- Montes, M., Pérez, M. J., Nieto, T. P., Larsen, J. L. y Christensen, H. (2003). Characterization of *Vibrio* strains isolated from turbot (*Scophthalmus maximus*) culture by phenotypic analysis, ribotyping and 16S rRNA gene sequence comparison. *J Appl Microbiol* 95, 693-703.
- Montes, M., Faro, R., Pérez, M. J., Armada, S. y Nieto, T. P. (2006). Genotypic diversity of *Vibrio* isolates associated with turbot (*Scophthalmus maximus*) culture. *Research Microbiol* 157, 487-495.
- Montilla, R., Palomar, J., Santmarti, M., Fuste, C. y Viñas, M. (1994). Isolation and characterization of halophilic *Vibrio* from bivalves bred in nurseries at the Ebre Delta. *J Invert Pathol* 63, 178-181.
- Morrison, C. y Shum, G. (1982). *Chlamydia*-like organisms in the digestive diverticula of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lmk). *J Fish Dis* 5, 173-184.
- Murchelano, R. A. y Brown, C. (1970). Heterotrophic bacteria in Long Island Sound. *Marine Biology* 7, 1-6.

- Murrell, A., Kleeman, S. N., Baker, S. C. y Lester, R. J. G. (2002). Synonymy of *Perkinsus olseni* Lester & Davis, 1981 and *Perkinsus atlanticus* Azevedo, 1989 and an update on the phylogenetic position of the genus *Perkinsus*. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 22, 258-265.
- Nhung P. H., Monir Shah M., Ohkusu, K., Noda, M., Hata, H., Song Sun X., Goto K., Masaki T., Miyasaka J. y Ezaki T. (2007). The *dnaJ* gene as a novel phylogenetic marker for identification of *Vibrio* species. *Sys Appl Microbiol* 30, 309-315.
- Nichols, D. S. (2003). Prokaryotes and the input of polyunsaturated fatty acids to the marine food web. *FEMS Microbiol Lett* 219, 1-7.
- Nicolas L., Corre S., Gauthier G., Robert R. y Ansquer D. (1996).** Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis Aquat Org* 27, 67-76.
- Nishiguchi, M. K. (2000). Temperature affects species distribution in symbiotic populations of *Vibrio* spp. *Appl Environm Microbiol* 66, 3550-3555.
- Noel, T., Aubree, E., Blateau, D., Mialhe, E. y Grizel, H. (1992). Treatments against the *Vibrio* P1, suspected to be responsible for mortalities in *Tapes philippinarum*. *Aquaculture* 107, 171-174.
- Noguerola I. y Blanch A. R. (2008). Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys. *J Appl Microbiol* 105, 175-85.
- Norén, F., Moestrup, Ø. y Rehnstan-Holm, A. S. (1999). *Pervilucifera infectans* gen et sp. nov. (Perkinsozoa phylum nov.): a parasitic flagellate capable of killing toxic microalgae. *Eur J Protistol* 35, 233-254.
- Norton, J. H., Shepherd M. A. y Prior, H. C. (1993). Intracellular bacteria associated with winter mortality in juvenile giant clam, *Tridacna gigas*. *J Invertebr Pathol* 62, 204-206.
- Nottage, A. S. y Birkbeck, T. H. (1986). Toxicity to marine bivalves of culture supernatant fluids of the bivalve-pathogenic *Vibrio* strain NCMB 1338 and other marine vibrios. *J Fish Dis* 10, 265-273.

- Nottage, A. S. y Birkbeck, T. H. (1987). Purification of a proteinase produced by the bivalve pathogen *Vibrio alginolyticus* NCMB 1339. *J Fish Dis* 10, 211-220.
- Nottage, A. S., Sinclair, P. D. y Birbeck, T. H. (1989). Role of low-molecular weight ciliostatic toxins in vibriosis of bivalve molluscs. *J Aquat Animal Health* 1, 180-186.
- Novoa, B., Posada, D. y Figueras, A. (2005). Polymorphisms in the sequences of *Marteilia* internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA genes (ITS-1) in Spain: genetic types are not related with bivalve hosts. *J Fish Dis* 28, 331-338.
- Nyholm, S. V. y McFall-Ngai, M. J. (1998). Sampling the light organ microenvironment of *Euprymna scolopes*: description of a population of host cells in association with the bacterial symbiont. *Biol Bull* 195, 89-97.
- Okada, K., Iida, T., Kita-Tsukamoto, K. y Honda, T. (2005). *Vibrios* commonly possess two chromosomes. *J Bacteriol* 187, 752-757.
- OIE (Office International des Epizooties) (2005). Aquatic animal health code, 8<sup>th</sup> ed. OIE, Paris.
- Ørmen, Ø., Granum, P. E., Lassen, J. y Figueras, M. J. (2005). Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. *APMIS* 113, 203-207.
- Ortigosa, M., Esteve, C. y Pujalte, M. J. (1989). *Vibrio* species in seawater and mussels: Abundance and numerical taxonomy. *System Appl Microbiol* 12, 316-325.
- Ortigosa, M., Garay, E. y Pujalte, M. J. (1994). Numerical taxonomy of *Vibrionaceae* isolated from oysters and seawater along an annual cycle. *Syst Appl Microbiol* 17, 216-225.
- O'Shea, T. M., DeLoney-Marino C. R., Shibata S., Aizawa, S. I., Wolfe, A. J. y Visick, K. L. (2005). Magnesium promotes flagellation of *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol* 187, 2058-2065.
- Paillard, C. (1994). A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquat Living Resour* 17, 467-475.
- Paillard, C. y Maes, P. (1989). Origine pathogène de l'“anneau brun” chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve). *C. R. Acad Sci Paris Ser. III*. 309, 235-241.



- Paillard, C. y Maes, P. (1994). The brown ring disease symptom in the manila clam *Ruditapes philippinarum*: Establishment of a classification system. *Dis Aquat Org* 19, 137-146.
- Paillard, C. y Maes, P. (1995). The brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. I. Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. *J Invert Pathol* 65, 91-100.
- Paillard, C., Gausson, S., Nicolas, J. L., Le Pennec, J. P. y Haras, D. (2006). Molecular identification of *Vibrio tapetis*, the causative agent of the brown ring disease of *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture* 253, 25-38.
- Paillard, C., Maes, P. y Oubella, R. (1994). Brown ring disease in clams. *Annual Review of Fish Diseases* 4, 219-240.
- Paillard, C., Percelay, L., Le Pennec, M. y Le Picard, D. (1989). Origine pathogène de “l’anneau brun” chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, Bivalve). *Comptes Rendus Academie Science Paris* 309, 235-241.
- Penna, M. S., Kham, M. y French, R. A. (2001). Development of a multiplex PCR for the detection of *Haplosporidium nelsoni*, *Haplosporidium costale* and *Perkinsus marinus* in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*, Gmelin, 1971). *Mol Cell Probes* 15, 385-390.
- Phadtare, S., Intuye, M. y Severinov, K. (2004). The mechanism of nucleic acid meeting by a CspA family protein. *J Mol Biol* 337, 147-155.
- Pichot, Y., Comps, M., Tigé, G., Grizel, H. y Rabouin, M. A. (1980). Recherche sur *Bonamia ostreae* gen n., sp. n., parasite nouveau de l’huître plate *Ostrea edulis* L. *Rev Trav Inst Scient Tech Pêch Marit* 43, 131-140.
- Plana, S. y Le Pennec, M. (1991). Altérations de la glande digestive et conséquences nutritionnelles chez la palourde *Ruditapes philippinarum* contaminée par une bactérie de genre *Vibrio*. *Aquat Living Resour* 4, 255-264.
- Prado, S., Romalde, J. L., Montes, J. y Barja J. L. (2005). Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. *Dis Aquat Org* 67, 209-215.

## ***Bibliografía***

---

- Prado, 2006. Microbiota asociada a criaderos de moluscos patogénesis y probiosis. PhD Thesis.
- Prado, S., Romalde J. L. y Barja J. L. (2008). *Vibrio ostreicida* sp nov., a new pathogen for flat oyster (*Ostrea edulis*) larvae. *Int J Syst Evol Microbiol* (In press).
- Prieur, D., Mével, G., Nicolas, J.L., Plusquellec, A. y Vigneulle, M. (1990). Interactions between bivalve mollusks and bacteria in the marine environment. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 28, 277-352.
- Pujalte, M. J., Ortigosa, M., Macian, M. C. y Garay, E. (1999). Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater. *Int Microbiol* 2, 259-266.
- Pyra, H., Böni, J. y Schüpbach, J. (1994). Ultrasensitive retrovirus detection by a reverse transcriptase assay based on product enhancement. *Proc Natl Acad Sci* 91, 1544-1548.
- Rademaker, J. L., Hoste, B., Louis, F. J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L. y de Bruijn, F. J. (2000). Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 665-677.
- Ragone-Calvo, L. M., Walker, J. G. y Bureson, E. M. (1998). Prevalence and distribution of QPX, Quahog Parasite Unknown, in hard clams *Mercenaria mercenaria* in Virginia, USA. *Dis Aquat Org* 33, 209-219.
- Rajagolapan, L. P. D. y Sivalingan, P. M. (1978). Bacteria flora of a great mussel (*Mytilus viridis* Linnaeus) and a naturally occurring rock oyster (*Crassostrea cuculata*). *Mar Appl Biol* 7, 43-47.
- Renault, T. y Arzul, I. (2001). Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe: specific viral DNA detection by PCR. *J Fish Dis* 24, 161-167.
- Renault, T., Chollet, B., Cochenec, N. y Gerard, A. (2002). Shell disease in eastern oysters, *Crassostrea virginica*, reared in France. *J Invert Pathol* 79, 1-6.
- Renault, T. N., Stokes, N. A., Chollet, B., Cochenec, N., Berthe, F., Gérard, A. y Bureson, E. M. (2000). Haplosporidiosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. *Dis Aquat Org* 42, 207-214.

Reichelt, J. L. y Baumann, P. (1973). Taxonomy of marine luminous bacteria. *Arch Microbiol* 94, 283-330.

**Reichelt, J. L. Baumann, P. y Baumann, L. (1976).** Study of genetic relationships among marine species of the genera *Beneckea* and *Photobacterium* by means of in vitro DNA / DNA hybridization. *Arch Microbiol* 50, 665-677.

**Riquelme, C., Araya, R., Vergara, N., Rojas, A., Guaita, M. y Candia, M. (1997).** Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 181, 25-36.

**Riquelme, C., Hayashida, G., Toranzo, A. E., Vilches, J. y Chávez, P. (1995).** Pathogenicity studies on a *Vibrio anguillarum*-related (VAR) strain causing an epizootic in *Argopecten purpuratus* larvae cultured in Chile. *Dis Aquat Org* 22, 135-141.

Riquelme, C., Hayashida, G., Araya, R., Uchida, A., Satomi, M. y Ishida, Y. (1996). Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. *J Shellfish Res* 15, 369-374.

Ripabelli, G., Sammarco, M. L., McLauchlin, J. y Fanelli, I. (2003). Molecular characterization and antimicrobial resistance of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio alginolyticus* isolated from mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Syst Appl Microbiol* 26, 119-126.

Rivera, I. G., Chowdhury, M. A. R., Hiq, A., Jacobs, D., Martins, M. T. y Colwell R. (1995). Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences and the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139 and Non-O1 strains. *Appl Environ Microbiol* 61, 2898-2904.

Robledo, J. A. F., Cáceres-Martínez, J., Sluys, R. y Figueras, A. (1994). The parasitic turbellarian *Urastoma cyprinae* (Platyhelminthes: Urastomidae) from the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* in Spain: Occurrence and pathology. *Dis Aquat Org* 18, 203-210.

Rodríguez, J. M., López-Romalde, S., Beaz, R., Alonso, M. C., Castro, D. y Romalde J. L. (2006). Molecular fingerprinting of *Vibrio tapetis* strains using three PCR-based methods: ERIC-PCR, REP-PCR and RAPD. *Dis Aquat Org* 69, 175-183.

## ***Bibliografía***

---

Romalde, J. L. (2005). Application of DNA fingerprinting techniques to the study of fish and shellfish pathogens, pp. 163-191 en *Trends in DNA Fingerprinting Research*, editado por M.M. Read. Nova Science Publishers, Inc. Nueva York.

**Romalde, J. L. y Toranzo, A. E. (1991).** Evaluation of the API 20E system for the routine diagnosis of the enteric redmouth disease. *Bull Eur Ass Fish Pathol* **11**, 147-149.

Romalde, J. L., Barja, J. L. y Toranzo, A. E. (1990). Vibrios associated with red tides caused by *Mesodinium rubrum*. *Appl Environment Microbiol* **56**, 3615-3619.

Romalde, J. L., Castro, D., Magariños, B., López-Cortés L. y Borrego, J. J. (2002). Comparison of ribotyping, pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA for molecular typing *Vibrio tapetis*. *Syst Appl Microbiol* **25**: 544-550.

Romalde, J. L., Rodríguez, J. M. y Borrego, J. J. (2007). Protocolo de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para detección e identificación de *Vibrio tapetis* a partir de cultivos puros del microorganismo y de tejidos de moluscos. Oficina Española de Patentes y Marcas. N° Publ. 2265707.

**Romalde, J. L., Vilarino, M. L., Beaz, R., Rodríguez, J. M., Díaz, S., Villalba, A. y Carballa, M. J. (2007).** Evidence of retroviral etiology for disseminated neoplasia in cockles (*Cerastoderma edule*). *J Invert Pathol* **94**, 95-101.

Romero, X., Thurnbull J. F. y Jiménez R. (2000). Ultrastructure and cytopathology of a rickettsia-like organism causing systemic infection in the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Crustacea: Decapoda), in Ecuador. *J Invertebr pathol* **76**, 95-104.

**Russell, N. J. y Hamamoto, T. (1998).** Psychrophiles. En *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments*. Editado por K. Horikoshi y W. D. Grant. Wiley-Liss, Inc, New York. pp. 25-45.

**Sáinz, J. C., Maeda-Martínez, A. N. y Ascencio, F. (1998).** Experimental vibriosis induction with *Vibrio alginolyticus* of larvae of the Catarina scallop (*Argopecten ventricosus=circularis*) (Sowerby II, 1842). *Microb Ecol* **35**, 188-192.

Santos, Y., Lallier, R., Bandín, I., Lamas, J. y Toranzo, A. E. (1991). Susceptibility of turbot (*Scophthalmus maximus*), coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to the strains of *Vibrio anguillarum* and their exotoxins. *J Appl Ichthyol* 7, 160-167

**Santos, Y., Romalde, J. L., Bandín, I., Magariños, B., Núñez, S., Barja, J. L. y Toranzo, A. E. (1993).** Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens. *Aquaculture* 116, 111-120.

**Saitou, N. y Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.

**Sawabe T. (2006).** The mutual partnership between *Vibrio halioticoli* and abalones. In *The Biology of Vibrios*, pp. 219-230. Edited by F. L. Thompson, B. Austin & J. Swings. Washington: ASM Press.

Sawabe, T., Oda, Y., Shiomi, Y. y Ezura, Y. (1995). Alginate degradation by bacteria isolated from the gut of sea urchins and abalones. *Microb Ecol* 30, 192-202.

**Sawabe, T., Sugimura, I., Ohtsuka, M., Nakano, K., Tajima, K., Ezura, Y. y Christen, R. (1998).** *Vibrio halioticoli* sp. nov., a non-motile alginolytic marine bacterium isolated from the gut of the abalone *Haliotis discus hannai*. *Int J Syst Bacteriol* 48, 573-580.

**Sawabe, T., Thompson, F. L., Heyrman, J., Cnckaert, M., Hayashi, K., Tanaka, R., Yoshimizu, M., Hoste, B., Swings, J. y Ezura, Y. (2002).** Fluorescent amplified fragment length polymorphism (FAFLP) and repetitive extragenic palindrome (rep)-PCR fingerprinting reveal host specific genetic diversity of *Vibrio halioticoli*-like strains isolated from the gut of Japanese abalone. *Appl Environ Microbiol* 68, 4140- 4144.

**Sawabe, T., Setoguchi, N., Inoue, S., Tanaka, R., Ootsubo, M., Yoshimizu, M. y Ezura, Y. (2003).** Acetic acid production of *Vibrio halioticoli* from alginate: a possible role for establishment of abalone *V. halioticoli* association. *Aquaculture* 219, 671-679.

Sawabe, T., Hayashi, K., Moriwaki, J., Fukui, Y., Thompson, F.L., Swings, J. y Christen, R. (2004a). *Vibrio neonatus* sp. nov., and *Vibrio ezurae* sp. nov. isolated from the gut of Japanese abalones. *Syst Appl Microbiol* 27, 527-534.

- Sawabe, T., Hayashi, K., Moriwaki, J., Thompson, F. L., Swings, J., Potin, P., Christen, R. y Ezura, Y. (2004b). *Vibrio gallicus* sp. nov., isolated from the gut of the French abalone *Haliotis tuberculata*. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 843-846.
- Sawabe, T., Fujimura, Y., Niwa K. y Aono, H. (2007). *Vibrio comitans* sp. nov., *Vibrio rarus* sp. nov. and *Vibrio inusitatus* sp. nov. from the gut of the abalones *Haliotis discus*, *H. gigantean*, *H. madaka* and *H. rufescens*. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 916-922.
- Seguineau C., Laschi- Loquerie, A., Moal, J. y Samai, J. F. (1996). Vitamin requirements in great scallop larvae. *Aquaculture International* 4, 315-324.
- Siddall, M. E., Reece, K. S., Graves, J. E. y Bureson, E. M. (1997). "Total evidence" refutes the inclusion of *Perkinsus* species in the phylum Apicomplexa. *Parasitol* 2, 165-176.
- Singh, D. V. y Mohapatra, H. (2008). Application of DNA-based methods in typing *Vibrio cholerae* strains. *Future Microbiol* 3, 87-96.
- Smith, H. (1984). The biochemical challenge of microbial pathogenicity. *J Appl Bacteriol* 47, 395-404.
- Smolowitz, R., Leavitt, D. y Perkins, F. (1998). Observations of a protistan disease similar to QPX in *Mercenaria mercenaria* (hard clam) from the coast of Massachusetts. *J Invertbr Pathol* 71, 9-25.
- Sobecky, P. A., Mincer, T. J., Chang, M. C. Toukdarian, A. y Helinski, D. R. (1998). Isolation of broad-host-range replicons from marine sediment bacteria. *Appl Environ Microbiol* 64, 2822-2830.
- Soler, L., Figueras, M. J., Chacón, M. R., Guarro, J. y Martinez-Murcia, A. J. (2003). Comparison of three molecular methods for typing *Aeromonas popoffii* isolates. *Antonie van Leeuwenhoek* 83, 341-349.
- Stabb, E. (2006).** The *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ symbiosis. In *The Biology of Vibrios*, pp. 204-218. Edited by F. L. Thompson, B. Austin & J. Swings. Washington: ASM Press.
- Stackerbrant, E., y Ebers, J. (2006).** Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology today* 33, 152-155.

- Stackerbrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Garrity, G. M., Grimont, A.D., Kämpfer, P., Maiden, M. C. J., Nesme, X., Roselló- Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A. y Whitman, W. B. (2002).** Report of the ad hoc comitee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1043-1047.
- Stern M. J., Ames, G. F. L., Smith, N. H., Robinson, E. C. y Higgins, C. F. (1984).** Repetitive extragenic palindromic sequences: a mayor component of the bacterial genome. *Cell* **37**, 1015-1026.
- Sugita, H., Tanaami, H., Kobashi, T. y Deguchi, Y. (1981).** Bacterial flora of coastal bivalves. *Bull Jpn Soc Scient Fish* **47**, 655-661.
- Sugumar, G., Nakai, T., Hirata Y., Matsubara D. y Muroga, K. (1998).** *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis Aquat Org* **33**, 111-118.
- Sun, J. y Wu, X. (2004).** Histology, ultrastructure, and morphogenesis of a rickettsia-like organism causing disease in the oyster, *Crassostrea ariakensis* Gould. *J Invert Pathol* **86**, 77-86.
- Sutton, D. C. y Garrick R. (1993).** Bacterial disease of cultured giant clam *Tridacna gigas* larvae. *Dis Aquat Org* **16**, 47-53.
- Svärd, L. (1999).** Bacteria, granulocytomas, and trematode metacercariae in the digestive gland of *Mytilus edulis*: seasonal and interpopulation variation. *J Invertebr Pathol* **74**, 275-280.
- Szczuka, E. y Kaznowski, A. (2004).** Typing of clinical and environmental *Aeromonas* sp. strains by random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR. *J Clin Microbiol* **42**, 220-228.
- Tacao, M., Alves, A., Saavedra, M.J. y Correira, A. (2005).** BOX-PCR is an adequate tool for typing *Aeromonas* spp. *Antonie Van Leewenhoek* **88**, 173-179.

**Thompson, F. L. y Swings, J. (2006).** Taxonomy of Vibrios. En *The Biology of Vibrios*, pp. 29-24- Editado por F. L. Thompson, B. Austin y J. Swings. Washington: ASM Press.

**Thompson, F. L., Hoste B., Vandeneulebroecke K. y Swings J. (2001).** Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different source determined by Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism. *Syst Appl Microbiol* **24**, 520-538.

Thompson, F. L., Thompson, C. C. y Swings, J. (2003a). *Vibrio tasmaniensis* sp. nov. isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Syst Appl Microbiol* **26**, 65-69.

Thompson, F. L., Thompson, C. C., Li, Y., Gomez- Gil, B., Vanderberghe, J., Hoste, B. y Swings, J. (2003b). *Vibrio kanaloae* sp. nov., *Vibrio pomeroyi* sp. nov. and *Vibrio chagasii* sp. nov., from sea water and marine animals. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 753-759.

Thompson, F. L., Thompson, C. C., Vicente, A. C., Theophilo, G. N. D., Hofer, E. y Swings, J. (2003c). Genomic diversity of clinical and environmental *Vibrio cholerae* strains isolated in Brazil between 1991 and 2001 as revealed by Fluorescent Amplified Length Polymorphism Analysis. *J Clin Microbiol* **41**, 1946-1950.

Thompson, F. L., Li, Y., Gomez- Gil, B., Thompson, C. C., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Rupp, G. S., Pereira, A., De Bem, M. M., Sorgeloos, P. y Swings, J. (2003d). *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 245-252.

Thompson, F. L., Thompson, C. C., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Gullian, M. y Swings, J. (2003e). *Vibrio fortis* sp. nov. and *Vibrio hepatarius* sp. nov., isolated from aquatic animals and the marine environment. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1495-1501.

Thompson C. C., Thompson F. L., Vandemeulebroecke, K., Hoste B., Dawyndt, P. y Swings J. (2004). Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family Vibrionaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 919-929.

Thompson F. L., Gevers D., Thompson C. C., Dawyndt P., Naser S., Hoste B., Munn C. B. y Swings J. (2005). Phylogeny and molecular identification of Vibrios on the basis of Multilocus Saquence Analysis. *Appl Environ Microbiol* **71**, 5107-5115.



- Thompson, C. C., Thompson, F. L., Vicente, A. C. y Swings, J. (2007).** Phylogenetic analysis of vibrios and related species by means of *atpA* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2480-2484.
- Thyssen, A., Van Eygen, S., Hauben, L., Goris, J., Swings, J. y Ollevier, F. (2000).** Application of AFLP for taxonomic and epidemiological studies of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 1013-1019.
- Thyssen, A. y Ollevier, F. (2005).** Genus II. *Photobacterium* Beijerinck 1889, 401<sup>AL</sup>. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> edn, vol. 2, part B, pp. 546-552. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer.
- Toranzo, A. E. y Barja, J. L. (1990).** A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Dis Aquat Org* **9**, 73-82.
- Toranzo, A. E. y Barja, J. L. (1993).** Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish. *Annu Rev Fish Dis* **3**, 5-36.
- Toranzo, A. E., Barja, J. L., Colwell, R. R., Hetrick, F. M. y Crosa, J. H. (1983).** Hemagglutinating, hemolytic and cytotoxic activities of *Vibrio anguillarum* and related vibrios isolated from striped bass on the Atlantic coast. *FEMS Microbiol Lett* **18**, 257-262.
- Tubiash, H. S. (1974).** Single and continuous exposure of the adult American oyster, *Crassostrea virginica*, to marine vibrios. *Can J Microb* **20**, 513-517.
- Tubiash, H. S., Chanley, P. E. y Leifson, E. (1965).** Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. I. Etiology and epizootiology. *J Bacteriol* **90**, 1036-1044.
- Tubiash, H. S., Colwell, R. R. y Sayazaki, R. (1970).** Marine vibrios associated with bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *J Bacteriol* **103**, 271-272.
- Urakawa, H., Kita-Tsukamoto, K., Steven, S. E., Ohwada, K. y Colwell R. R. (1998).** A proposal to transfer *Vibrio marinus* (Russell 1891) to a new genus *Moritella* gen. nov. as *Moritella marina* comb. nov. *FEMS Microbiol Lett* **165**, 373-378.

**Urakawa, H., Kita-Tsukamoto, K. y Ohwada, K. (1999a).** Reassessment of the taxonomic position of *Vibrio iliopiscarius* (Onarheim *et al.* 1994) and proposal for *Photobacterium iliopiscarium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 257-260.

Urakawa, H., Kita- Tsukamoto, K. y Ohwada, K. (1999b). 16S rDNA restriction fragment length polymorphism analysis of psychrotrophic vibrios from Japanese coastal water. *Can J Microbiol* **45**, 1001-1007.

Urbanczyk, H., Ast, J. C., Higgins, M. J., Carson, J. y Dunlap, P. V. (2007). Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Allivibrio logei* comb. nov., *Allivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2823-2829.

Urwin, R. y Maiden, M. C. J. (2003). Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol* **11**, 479- 487.

van Baar, B. L. M. (2000). Characterisation of bacteria by matrix assisted laser desorption/ionisation and electrospray mass spectrometry. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 193-219.

Vandenberghe J., Verdonk L., Robles-Arozanera R., Rivera G., Bolland A., Balladares M., Gomez-Gil B., Calderon J., Zorruelos P. y Swings J. (1999). Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2592-2597.

Versalovic, J., Koeuth, T. y Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **19**, 6823-6831.

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. y Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 655-671.

Villalba, A., Carballal, M. J., López, C., Cabada, A., Corral, L. y col. (1999). Branchial rickettsia-like infection associated with clam *Venerupis rhomboides* mortality. *Dis Aquat Org* **36**, 53-60.

Villalba, A., Carballal, M. J. y López, C. (2001). Disseminated neoplasia and large foci indicating heavy haemocytic infiltration in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (NW Spain). *Dis Aquat Org* **46**, 213-216.

- Villalba, A., López, M. C. y Carballal, M. J. (1993a). Parásitos y alteraciones patológicas de tres especies de almeja *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra*, y *Venerupis rhomboides*, en las costas gallegas. En: Actas IV Congreso Nacional de Acuicultura, 551-556.
- Villalba, A., Mourelle, S. G., Lopez, M. C., Carballal, M. J. y Azevedo, C. (1993b).** Marteiliasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW Spain). I. Etiology, phases of the infection, and temporal and spatial variability in prevalence. *Dis Aquat Org* **16**, 61-72.
- Villalba, A., Peters, E. C., Lopez, M. C. y Carballal, M. J. (1995).** Disseminated sarcoma in the clam *Ruditapes decussatus* in Galicia (NW Spain). *J InvertPathol* **65**, 76-78.
- Villalba, A., Reece, K. S., Ordás, M. C., Casas, S. M. y Figueras, A. (2004).** Perkinsosis in molluscs: A review. *Aquat Liv Res* **17**, 411-432.
- Villalba, A., Casas, S. M., López, C. y Carballal, M. J. (2005).** Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and associations with clam mortality. *Dis Aquat Org* **65**, 257-267.
- Volety, A. K., Oliver, L. M., Genthner, F. J. y Fischer, W. S. (1999).** A novel and rapid assay to assess the bactericidal activity of oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes against *V. parahaemolyticus*, a pathogenic bacterium: standardization and optimization using tetrazolium dye reduction. *Aquaculture* **172**, 205-222.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. y Zabeau M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* **23**, 4407-4414.
- Waechter M., Le Roux F., Nicolas J. L., Marissal E. y Berthe F. (2002). Characterization of pathogenic bacteria of the cupped oyster *Crassostrea gigas*. *C R Biol* **325**, 231-238.
- Walne, P. R. (1958). The importance of bacteria in laboratory experiments on rearing the larvae of *Ostrea edulis* (L.). *J mar biol Ass U.K.* **37**, 415-425.

## ***Bibliografia***

---

- Wang, X. H., Oon, H. L., Ho, G. W. P., Wong, W. S. F., Lin, T. M. y Leung, K. Y. (1998). Internalization and citotoxicity are important virulence mechanisms in vibrio-fish epithelial cell interactions. *Microbiology* 144, 2987-3002.
- Wang, Q., Liu, Q., Ma, Y. y Zhang, Y. (2007). LuxO controls extracellular protease, haemolytic activities and siderophore production in fish pathogen *Vibrio alginolyticus*. *J Appl Microbiol* 103, 1525-1534.
- Ward, J. E., Levinton, J. S., Shumway, S. E. y Cucci, T. L. (1997). Site of particle selection in a bivalve mollusk. *Nature* 390, 131-132.
- Ward, M. E., Shields J. D. y Van Dover C. L. (2004). Parasitism in species of *Bathymodiolus* (Bivalvia: Mytilidae) mussels from deep-sea and hydrothermal vents. *Dis Aquat Org* 62, 1-16.
- West, P. A., Brayton, P. R., Bryant, T. N. y Colwell, R. R. (1986). Numerical taxonomy of vibrios isolated from aquatic environments. *Int J Syst Bacteriol* 36, 531-543.
- Whatmore, A. M., Murphy, T. J., Shankster, S., Young, E., Cutler, S. J. y Macmillan, A. P. (2005). Use of Amplified Fragment Length Polymorphism to identify and type *Brucella* isolates of medical and veterinary interest. *J Clin Microbiol* 43, 761-769.
- Whyte, S. K., Cawthorn, R. J. y McGladdery, S. E. (1994). QPX (Quahaug Parasite X), a pathogen of northern quahaug *Mercenaria mercenaria* from the Gulf of St. Lawrence, Canada. *Dis Aquat Org* 19, 129-136.
- Wilson, K. (1987). Preparation of genomic DNA from bacteria. In *Current Protocols in Molecular Biology*, pp. 2.4.1.-2.4.5. Edited by F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl. New York: Green Publishing and Wiley-Interscience.
- Wright, A. C., Hill, R. T., Johnson, J. A., Roghman, M. C., Colwell, R. R. y Morris, J. (1996). Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay. *Appl Environm Microbiol* 62, 717-724.
- Wong, H. C. y Lin, C. H. (2001). Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific primers. *J Clin Microbiol* 39, 4233-4240.
- Woo, Y.K y Lee, S.H. (2006). Genetic diversity of multi resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from animals and humans. *J. Microbiol* 44, 106-112.

Wu, X. y Pan, J. (1999). Studies on *Rickettsia*-like organism disease of the Tropical marine pearl oyster. I: The fine structure and morphogenesis of *Pinctada maxima* pathogen *Rickettsia*-like organism. *J Invertebr Pathol* 73, 162-172.

Wu, X. y Pan, J. (2000). An intracellular prokaryotic microorganism associated with lesions in the oyster *Crassostrea ariakensis* Gould. *J Fish Dis* 23, 409-414.

Zeigler, D. R. (2003). Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 1893-1900.

## ANEXO I

**Lista completa de las cepas incuadas en el análisis de AFLP.** **Cluster 1.** LMG 20015 (A24), R-15059 (A24), R-15062 (A24), R-15063 (A24), LMG 16868, *Vibrio vulnificus* LMG 13545<sup>T</sup> (A24); **Cluster 2.** LMG 19990 (A11), R-15025 (A11), LMG 16852, LMG 16867; **Cluster 3.** *Listonella pelagia* LMG 3897<sup>T</sup> (A10), LMG 19995 (A10), LMG 11752; **Unclassified.** R-14818 (A58); **Unclassified.** INCO 293 (A58); **Cluster 4.** R-14841 (A45), LMG 21574 (VIB 840) (A45), LMG 21575 (VIB 848) (A45), *Vibrio tasmaniensis* LMG 20012<sup>T</sup> (A45), VIB 846 (A45), LMG 21576 (VIB 842) (A45); **Cluster 5.** KV 3 (A58), KV 4 (A58), R-14807 (A56), LMG 23856 (R-33660), R-33657, R-33712, R-33678, R-33631, R-33636. **Cluster 6.** R-14798 (A50), R-14797 (A50), R-3734 (A50), R-3874 (A50), R-14796 (A50), *Vibrio splendidus* LMG 19031<sup>T</sup> (A50), R-14789 (A50), R-14799 (A50), R-14800 (A50), R-33745, R-33647, R-33646, R-33649, LMG 23853 (R-33648), R-33651, R-33643, R-33751, LMG 23852 (R-33642); **Cluster 7.** R-33644, R-33696, R-33659, R-33669, R-33645, LMG 23851 (R-33638), LMG 16749 (A58), LMG 23854 (R-33654), LMG 16751 (A50), LMG 16752 (A50), R-14792 (A50), R-14788 (A50); **Cluster 8.** LMG 22242, LMG 22249, *Vibrio crassostreae* LMG 22240<sup>T</sup>, LMG 22241, VIB 239 (A50); LMG 13242 (A50), R-33675, LMG 23860 (R-33695), R-33747, R-33630; **Cluster 9.** R-33750, R-33768, LMG 23850 (R-33635), R-33665, R-33731; **Cluster 10.** LMG 10952 (A59), LMG 13221 (A59); **Cluster 11.** LMG 21352 (VIB 556) (A51), LMG 21351 (VIB 575) (A51), INCO 41 (A58); **Cluster 12.** R-3765 (A53), LMG 21354 (R-3722) (A53), R-3718 (A53), R-3803 (A53), *Vibrio chagasii* LMG 21353<sup>T</sup> (R-3712<sup>T</sup>) (A53); **Cluster 13.** LMG 13239 (A52), LMG 13237 (A52), LMG 13251 (A52), LMG 23855 (R-33658), LMG 13222 (A52), LMG 13238 (A52), R-33767, LMG 13219 (A52), LMG 13220 (A52), LMG 23849 (R-33633); **Cluster 14.** LMG 21355 (R-3884) (A55), R-3895 (A55), R-3893 (A55), R-3743 (A55), LMG 23863 (R-33710), R-3841 (A55), R-3916 (A55), LMG 21356 (R-3912) (A55); **Cluster 15.** LMG 20008 (A11), R-15028 (A11), R-14808 (A56); **Cluster 16.** R-33753, R-33634, R-33765; **Cluster 17.** LMG 21556 (INCO 297) (A9), *Vibrio fortis* LMG 21557<sup>T</sup> (STD3-1247<sup>T</sup>) (A9), LMG 21558 (STD3-931) (A9); **Cluster 18.** LMG 21559 (VIB 839) (A9), LMG 21561 (INCO 257) (A9), LMG 21566 (INCO 386) (A60), LMG 21565 (INCO 409) (A60), LMG 21569 (INCO 406) (A60), LMG 21570 (INCO 384) (A60), LMG 21564 (INCO 336) (A60), LMG 20547 (A60), LMG 21567 (INCO 312) (A60), LMG 21568 (INCO 311) (A60), LMG 21563 (INCO 35) (A9), LMG 21562 (INCO 31) (A9), LMG 21562 (INCO 305) (A9); **Cluster 19.** R-33732, R-33738, R-33761, R-33637, *Vibrio cyclitrophicus* LMG 21359<sup>T</sup>, R-33663, R-33666, LMG 23857 (R-33671), LMG 23859 (R-33694), R-33715, R-33713, R-33661, R-33714, R-33662, R-33653, R-14870 (A61), R-33655, LMG 21580 (R-14874) (A61), R-14873 (A61), R-1556 (A61), R-1578 (A61), R-1563 (A61), R-1572 (A61), R-14872 (A61), R-3784 (A61), R-3781 (A61), R-3891 (A61), R-3761 (A61), R-33693, R-14869 (A61), LMG 20001 (A61), R-33641; **Unclassified.** R-14875 (A61); **Cluster 20.** R-3787 (A59), R-14827 (A59); **Cluster 21.** *Vibrio rumoiensis* LMG 20038<sup>T</sup> (A58), LMG 20039 (A58); **Unclassified.** *Vibrio penaeicida* LMG 19663<sup>T</sup> (A58); **Unclassified.** R-33719; **Unclassified.** LMG 11229 (A58); **Unclassified.** R-33720; **Cluster 22.** R-33639, R-33628, LMG 19704 (A58), LMG 19705 (A58), *Vibrio tapetis* LMG 19706<sup>T</sup> (A58); **Unclassified.** LMG 22224; **Unclassified.** STD3-1202 (A58); **Cluster 23.** *Vibrio gigantis* LMG 22741<sup>T</sup>, LMG 22742; **Unclassified.** *Photobacterium profundum* LMG 19446<sup>T</sup>; **Cluster 24.** LMG 20550 (A43), LMG 20549 (A43), *Vibrio pectenica* LMG 19642<sup>T</sup> (A43), LMG 20551 (A43), R-14860 (A43), R-33716, INCO 200 (A13); **Cluster 25.** R-14802 (A51), R-14801 (A51), LMG 19269 (A51), *Vibrio pomeroyi* LMG 20537<sup>T</sup> (A51); **Cluster 26.** R-33754, R-33656, R-33752, R-33736; **Cluster 27.** LMG 11753 (A46), LMG 21522 (STD3-1036) (A46), *Vibrio kanaloae* LMG 20539<sup>T</sup> (A46), LMG 21521 (R-15012) (A46), LMG 21523 (STD3-1085) (A46); **Cluster 28.** R-14878 (A62), R-14881 (A62), R-14880 (A62), R-14884 (A62), R-14879 (A62), R-14885 (A62), LMG 19993 (A62), R-14876 (A62), R-14889 (A62), LMG 4407 (A62), R-14893 (A62), LMG 2174 (A62), R-14894 (A62), R-14891 (A62), R-14892 (A62), R-33705, LMG 23861 (R-33707), R-33703, R-33698, R-14896 (A62), R-14883 (A62), R-14882 (A62), R-14886 (A62), R-14887 (A62), *Vibrio alginolyticus* LMG 4409<sup>T</sup> (A62), LMG 23870 (R-33757), R-3788 (A59); **Unclassified.** R-14888 (A62); **Cluster 29.** R-33706, LMG 23862 (R-33708), R-14785(A49), R-33709, R-14784 (A49), *Vibrio diabolicus* LMG 19805<sup>T</sup> (A49), R-14786 (A49), R-14787 (A49), LMG 23867 (R-33748); **Cluster 30.** LMG 16851 (A59), R-14825 (A59); **Unclassified.** R-33623; **Unclassified.** INCO 29 (A58); **Unclassified.** R-33692; **Unclassified.** R-3700 (A58); **Unclassified.** R-3696 (A59); **Cluster 31.** R-1491 (A58), TAR9 (A59); **Cluster 32.** LMG 10940, (A56), LMG 19445 (A56), *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* LMG 7892<sup>T</sup> (A56); **Unclassified.** R-33717; **Cluster 33.** R-14809 (A56), LMG 19994 (A56), R-15108 (A5), R-15111 (A5), R-15112 (A5), LMG 20613 (A5), LMG 20614 (A5), LMG 20612 (A5), R-1592 (A5), R-1575 (A5), R-15121 (A5), R-15119 (A5), R-1579 (A5), LMG 20611 (A5), R-15116 (A5), R-15117 (A5), R-15120 (A5), R-15118 (A5), R-15113 (A5), LMG 20610 (A5), R-15123 (A5), *Vibrio neptunius* LMG 20536<sup>T</sup> (A5), LMG 20615 (A5); **Cluster 34.** R-14958 (A1), R-14957 (A1), LMG 10953 (A1), R-14955 (A1), R-14965 (A2), LMG 20540 (A2), R-14966 (A2), R-14968 (A2), R-14969 (A2), R-14970 (A2), LMG 20544 (A3), LMG 19270 (A3), LMG 20545 (A3), R-14972 (A3), R-14975 (A3), LMG 20543 (A3), LMG 20541 (A3), R-14959

(A1), R-14960 (A1), INCO 407 (A4), INCO 377 (A4), INCO 376 (A4), INCO 404 (A4), LMG 20548 (A4), INCO 383 (A4), INCO 385 (A4), INCO 400 (A4), INCO 388 (A4), INCO 382 (A4), R-14961 (A1), R-14962 (A1), LMG 20538 (A1), R-14963 (A1); **Cluster 35.** LMG 21348, *Vibrio coralliilyticus* LMG 20984<sup>T</sup>; **Unclassified.** R-33680; **Unclassified.** R-33681; **Unclassified.** *Photobacterium angustum* LMG 8455<sup>T</sup> (A56); **Cluster 36.** R-33674, R-33686; **Unclassified.** R-33740; **Cluster 37.** R-33683, R-33684, R-33690, R-33691, LMG 33858 (R-33677), R-33679, R-33722; **Cluster 38.** LMG 21322; *Vibrio superstes* LMG 21323<sup>T</sup>, LMG 21321; **Unclassified.** R-3691(A59); **Unclassified.** LMG 11668 (A59); **Unclassified.** LMG 11658 (A59); **Unclassified.** LMG 19998 (A59); **Cluster 39.** *Vibrio harveyi* LMG 4044<sup>T</sup> (A36), LMG 11226 (A36), LMG 7890 (A36), R-14948 (A36), R-14951 (A36), R-14950 (A36), R-14952 (A36), R-14949 (A36), R-14946 (A36), R-14947 (A36), *Vibrio harveyi* LMG 19643<sup>T</sup> (A36), LMG 19714 (A36) **Unclassified.** LMG 20977; **Cluster 40.** R-14922 (A30), R-14920 (A30), LMG 11659 (A30), LMG 10948 (A30), LMG 10946 (A30), LMG 10947 (A30), R-14925 (A30), R-14912 (A30), R-14917 (A30), R-14921 (A30), R-14918 (A30), LMG 4043 (A30), R-14913 (A30), R-14919 (A30); **Cluster 41.** R-14908 (A14), *Vibrio campbellii* LMG 11216<sup>T</sup> (A14), LMG 11256 (A14), LMG 11257 (A14); **Cluster 42.** R-14835 (A59), VIB 853 (A59); **Unclassified.** R-33741; **Cluster 43.** LMG 16835 (A37), LMG 16830 (A37), LMG 16828 (A37), R-14905 (A37), LMG 13241 (A37), R-14899 (A37), R-14900 (A37), R-14901 (A37), LMG 21363; **Cluster 44.** LMG 21361, LMG 20369 (A37), R-14902 (A37); **Cluster 45.** R-14927 (A32), R-14926 (A32), R-14932 (A32), LMG 13950 (A32), R-14930 (A32), LMG 21457 (RFT 41) (A33), LMG 21456 (RFT 51) (A33), LMG 21458 (RFT 61) (A33), *Vibrio rotiferianus* LMG 21460<sup>T</sup> (R-14939<sup>T</sup>) (A33), LMG 21459 (RFT 33) (A33), LMG 13949 (A32); **Cluster 46.** R-14933 (A32), R-14934 (A32); **Unclassified.** R-15041 (A12); **Unclassified.** VIB 617 (A13); **Cluster 47.** LMG 11259 (A6), *Vibrio mediterranei* LMG 11258<sup>T</sup> (A6), LMG 11663 (A6), LMG 16836 (A6), R-14988 (A6), R-14989 (A6), R-14993 (A6), R-14990 (A6), LMG 23868 (R-33749), LMG 23871 (R-33764), R-14995 (A6); **Cluster 48.** R-33664, R-33625, R-33624; **Cluster 49.** LMG 21448, *Vibrio agarivorans* LMG 21449<sup>T</sup>; **Cluster 50.** LMG 13245 (A47), *Vibrio pacinii* LMG 19999<sup>T</sup> (A47), LMG 21514 (A47), **Unclassified.** LMG 14011 (A11); **Cluster 51.** LMG 22227, *Photobacterium rosenbergii* LMG 22223<sup>T</sup>; **Cluster 52.** *Vibrio ichthyenteri* LMG 19664<sup>T</sup> (A63), R-14897 (A63), R-14898 (A63), R-3882 (A63), R-3858 (A63), R-3911 (A63), R-3904 (A63), R-3854 (A63), R-3774 (A63), R-3815 (A63), R-3789 (A63), R-3885 (A63), LMG 23864 (R-33718); **Cluster 53.** R-33758, R-33682; **Unclassified.** *Vibrio tubiashii* LMG 10936<sup>T</sup> (A59); **Unclassified.** R-33673; R-33702; **Unclassified.** R-33711, **Unclassified.** R-33626; **Cluster 54.** R-15054 (A48), *Vibrio natriegens* LMG 10935<sup>T</sup> (A48), R-15055 (A48), LMG 2225 (A48), LMG 11227, LMG 10950; **Unclassified.** R-15058 (A48); **Unclassified.** *Vibrio orientalis* LMG 7897<sup>T</sup>; **Cluster 55.** LMG 16874 (A42), LMG 16842 (A42), *Vibrio parahaemolyticus* LMG 2850<sup>T</sup> (A42), ATCC 17803 (A42), LMG 23866 (R-33743), LMG 11670 (A42); **Cluster 56.** R-15768 (A66), R-15767 (A66), R-15765 (A66), R-15766 (A66), LMG 19966 (A66), LMG 19969 (A66), R-15764 (A66), LMG 19967 (A66), LMG 19968 (A66), *Vibrio ezurae* LMG 19970<sup>T</sup> (A66), LMG 19979 (A66), R-15769 (A66); **Unclassified.** *Vibrio cincinnatiensis* LMG 7891<sup>T</sup> (A12); **Unclassified.** LMG 10950 (A12); **Unclassified.** R-15042 (A12); **Cluster 57.** LMG 4412 (A15); *Vibrio fischeri* LMG 4414<sup>T</sup> (A15); **Cluster 58.** R-33699, R-33700; **Cluster 59.** LMG 21329, *Vibrio gallicus* LMG 21878<sup>T</sup>; **Unclassified.** R-33746; **Cluster 60.** *Photobacterium leignathi* LMG 4228<sup>T</sup> (A54), LMG 11221 (A54), LMG 10944 (A54), LMG 4229, LMG 4230; **Cluster 61.** *Vibrio brasiliensis* LMG 20546<sup>T</sup> (A8), R-15002 (A8), R-15003 (A8), R-15005 (A8), R-15004 (A8), LMG 20010 (A8), R-15007 (A8); **Cluster 62.** LMG 20033 (A34), R-3706 (A34), LMG 11217 (A34), R-14942 (A34), LMG 11218 (A34); **Cluster 63.** LMG 13218 (A57), *Vibrio diazotrophicus* LMG 7893<sup>T</sup> (A57); **Cluster 64.** LMG 13211 (A16), LMG 13213 (A16), *Vibrio hispanicus* LMG 13240<sup>T</sup> (A16); **Unclassified.** LMG 13217 (A12); **Cluster 65.** R-14838 (A44), *Vibrio nereis* LMG 3895<sup>T</sup> (A44), R-14839 (A44), R-14840 (A44), LMG 11667; **Cluster 66.** R-14945 (A35), R-14943 (A35), *Vibrio aestuarianus* LMG 7909<sup>T</sup> (A35), R-14944 (A35); **Cluster 67.** R-33685, R-33688; **Unclassified.** R-33640; **Unclassified.** *Vibrio logei* LMG 19806<sup>T</sup> (A11); **Unclassified.** *Photobacterium iliopiscarium* LMG 19543<sup>T</sup> (A15); **Unclassified.** LMG 20542 (A59); **Cluster 68.** R-33667, R-33668, R-33650; **Unclassified.** R-33672; **Cluster 69.** R-33766, R-33737; **Cluster 70.** R-33673, R-33676, R-33687, R-33627, R-33670, R-33729, LMG 23865 (R-33727), R-33733, R-33728; **Unclassified.** *Photobacterium indicum* LMG 22857<sup>T</sup>; **Unclassified.** *Vibrio ruber* LMG 23124<sup>T</sup>; **Cluster 71.** *Vibrio mimicus* LMG 7896<sup>T</sup> (A41), R-14850 (A41); **Unclassified.** *Vibrio nigripulchritudo* LMG 3896<sup>T</sup> (A13); **Cluster 72.** *Vibrio cholerae* LMG 16743 (A40), R-14847 (A40), LMG 19996 (A40), LMG 4406 (A40); **Cluster 73.** LMG 4416 (A20), *Vibrio metschnikovii* LMG 11664<sup>T</sup> (A20), LMG 4426 (A20), VIB 478, LMG 11665 (A59); **Unclassified.** *Photobacterium phosphoreum* LMG 4233<sup>T</sup> (A19); **Cluster 74.** LMG 10870 (A38), LMG 10867 (A38), LMG 10861 (A38), R-15082 (A38), LMG 1411 (A38), LMG 10869 (A38); **Cluster 75.** R-15106 (A39), R-15107 (A39), *Vibrio ordalii* LMG 13544<sup>T</sup> (A39), LMG 10951 (A39), R-15099 (A39), R-15101 (A39), R-15098 (A39), R-15104 (A39), R-15105 (A39), R-15103 (A39); **Cluster 76.** LMG 10866 (A38), *Listonella anguillarum* LMG 4437<sup>T</sup> (A38); **Cluster 77.** R-33760, R-33762; **Unclassified.** *Enterovibrio corallii* LMG 22228<sup>T</sup>; **Cluster 78.** *Vibrio scopthalmi* LMG 19158<sup>T</sup> (A17), R-15029 (A17), LMG 20023 (A17); **Cluster 79.** LMG 19980 (A54), *Vibrio mytili* LMG 19157<sup>T</sup> (A54), LMG 16865, LMG 16866; **Unclassified.** R-33632; **Cluster 80.**

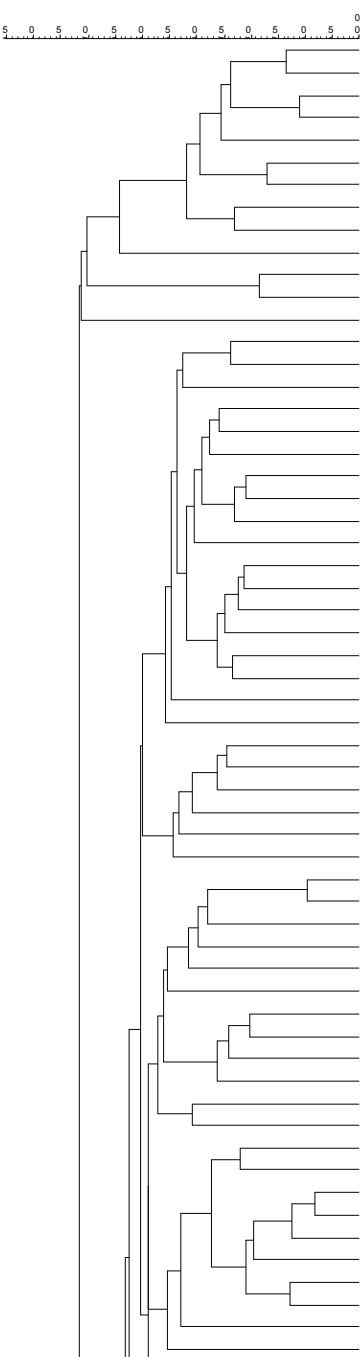
R-15759 (A64), LMG 19972 (A64)); LMG 19971 (A64), R-15760 (A64), R-15761 (A64), LMG 19978 (A64), LMG 19976 (A65), LMG 19977 (A65), R-15762 (A64), R-15763 (A64), *Vibrio neonatus* LMG 19973<sup>T</sup> (A64); **Cluster 81.** LMG 19975 (A67), R-15772 (A67), LMG 19974 (A67), R-15784 (A67), R-15782 (A67), R-15781 (A67), LMG 19964 (A67), R-15778 (A67), R-15779 (A67), R-15780 (A67), R-15783 (A67), R-15770 (A67), LMG 19965 (A67), R-15773 (A67), R-15777 (A67), R-15776 (A67), R-15775 (A67), R-15774 (A67), LMG 19701 (A67), LMG 19702 (A67), LMG 19700 (A67), LMG 19963 (A67), R-15771 (A67): *Vibrio halioticoli* LMG 18542<sup>T</sup> (A67); **Cluster 82.** R-33730, R-33735, R-33739; **Unclustered.** R-33652; **Cluster 83.** R-15757 (A57), R-15758 (A57); **Unclustered.** R-33704; **Unclustered.** LMG 11653; **Cluster 84.** R-14996 (A7), R-14997(A7), R-14998 (A7), *Vibrio wodanis* LMG 21011<sup>T</sup> (NCIMB 13582<sup>T</sup>) (A7), R-15000 (A7), R-14999 (A7); **Cluster 85.** LMG 20011 (A23), *Vibrio xuii* LMG 21346<sup>T</sup> (A23), LMG 21347 (A23); **Unclustered.** LMG 20368 (A49); **Unclustered.** *Vibrio gazogenes* LMG 19540<sup>T</sup> (A21); **Unclustered.** *Vibrio salmonicida* LMG 14010<sup>T</sup> (A21); **Unclustered.** LMG 13222; **Unclustered.** R-33734; **Unclustered.** *Photobacterium lipolyticum* LMG 23071<sup>T</sup>; **Cluster 86.** R-33759, R-33697, R-33756, LMG 23869 (R-33755); **Unclustered.** R-33701; **Unclustered.** R-14856 (A19); **Unclustered.** R-33689; **Unclustered.** R-33721; **Unclustered.** R-33723; **Unclustered.** R-15013; **Cluster 87.** R-3814 (A68), R-3729 (A68), R-3749 (A68), R-3847 (A68), R-3773 (A68), R-3717 (A68), R-3929 (A68), LMG 19841 (A69), R-3708 (A69), R-3719 (A69), *Enterovibrio norvegicus* LMG 19839<sup>T</sup> (A69), R-3731 (A68), R-3668 (A68), R-3759 (A68), LMG 19842 (A68), R-3764 (A68), R-3819 (A68), R-3678 (A68), LMG 20957 (R-3692) (A68), R-3727 (A68), R-3792 (A68), LMG 19840 (A68); **Unclustered.** R-33629; **Unclustered.** R-33744; **Unclustered.** *Vibrio navarrensis* LMG 15976<sup>T</sup> (A18); **Cluster 88.** R-15050 (A22), *Salinivibrio costicola* subsp. *costicola* LMG 11651<sup>T</sup> (A22); **Unclustered.** R-33724; **Cluster 89.** *Vibrio hepatarius* LMG 20362<sup>T</sup> (A26), LMG 20366 (A26), LMG 20378 (A26), LMG 20371 (A26); **Cluster 90.** LMG 20373 (A31), LMG 20376 (A31), LMG 20370 (A31); **Unclustered.** LMG 19988 (A12); **Unclustered.** *Vibrio calviensis* LMG 21294<sup>T</sup>; **Cluster 91.** R-15088 (A27), *Vibrio fluvialis* LMG 7894<sup>T</sup> (A27), LMG 11654 (A27), R-15090 (A27); **Cluster 92.** VIB 554 (A28), R-15093 (A28), *Allomonas enterica* LMG 8552<sup>T</sup>; **Cluster 93.** LMG 11656 (A29), *Vibrio furnissii* LMG 7910<sup>T</sup> (A29), LMG 11655 (A29), LMG 11757 (A29), LMG 11758 (A29); **Unclustered.** LMG 4231; **Unclustered.** R-33742; **Unclustered.** *Vibrio aerogenes* LMG 19650<sup>T</sup> (Unclustered); **Cluster 94.** LMG 16837 (A25), R-15065 (A25), LMG 10942, *Vibrio proteolyticus* LMG 3772<sup>T</sup> (A25); **Unclustered.** R-3681 (Unclustered); **Unclustered.** R-33725; **Unclustered.** R-1586 (Unclustered); **Unclustered.** LMG 21538 t1; **Unclustered.** *Grimontia hollisae* LMG 17719<sup>T</sup> (Unclustered).

LMG, BCCM/LMG Bacteria Collection (Laboratory de Microbiología, Universidad de Gante, Gante, Bélgica, <http://www.belspo.be/bccm>); R-, Colección de investigación (Research Collection) en el Laboratorio de Microbiología, Universidad de Gante, Gante, Bélgica; T, cepa tipo. Para las cepas de referencia del trabajo de Thompson *et al.* (2001) los clusters de AFLP en su estudio se detallan en paréntesis.

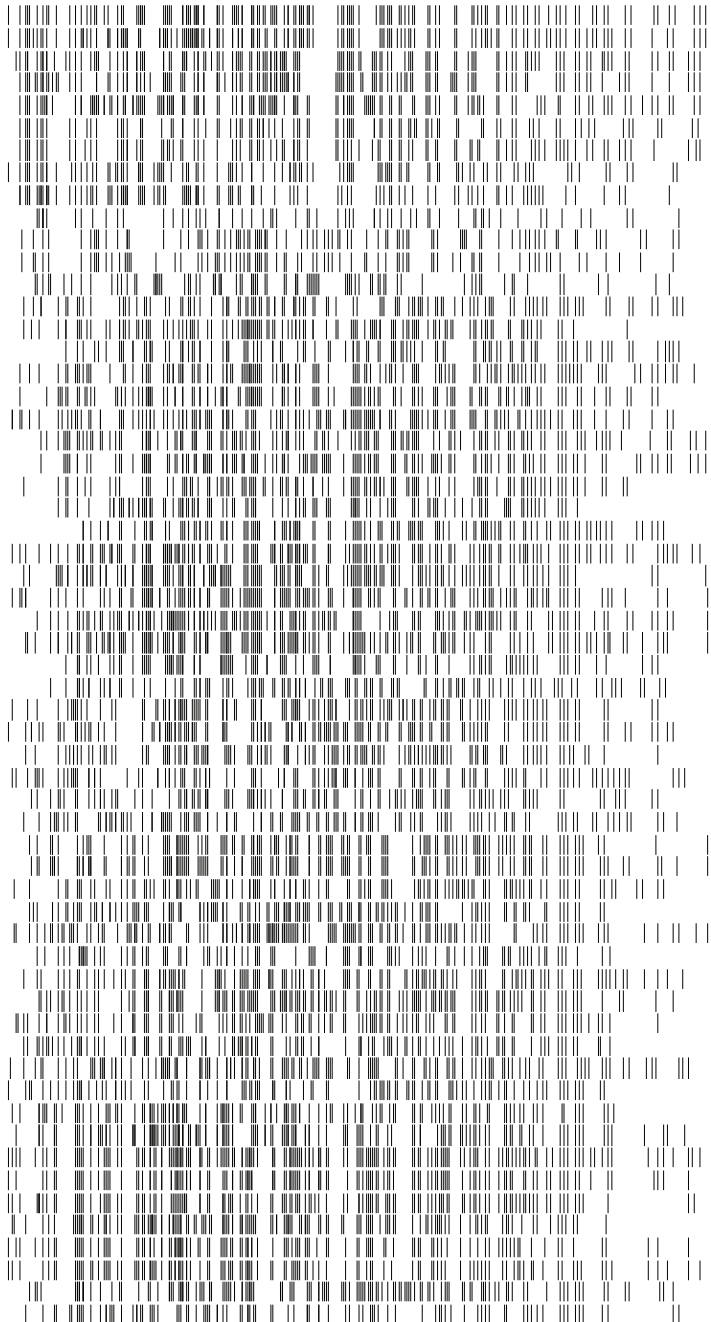


Cluster de AFLP

D=0.174 0.03%-0.03% (H=0.01% S=0.0%) [2.7%-82.4%]  
f-AFLP



f-AFLP



LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33690
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33691
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33677
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33679
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33722
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33684
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33684
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33683
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33683
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33724
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33760
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33762
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33704
	Vibrio splendidus	REF FT cluster A50
	Vibrio splendidus	REF FT cluster A50
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio splendidus	LMG 19031T
		LMG 19031T
		R-33642
	Vibrio splendidus	KV2
	Vibrio splendidus	REF FT cluster A50
	Vibrio splendidus	REF FT cluster A50
	Vibrio splendidus	REF FT cluster A50
	Vibrio splendidus	REF FT cluster A50
	Vibrio splendidus	REF FT cluster A50
	Vibrio splendidus	REF FT cluster A50
	Vibrio splendidus	REF FT cluster A50
	Vibrio splendidus	REF FT cluster A50
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio splendidus	R-33745
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio splendidus	R-33647
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio splendidus	R-33646
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio splendidus	R-33649
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio splendidus	R-33648
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio splendidus	R-33651
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio splendidus	R-33643
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio splendidus	R-33751
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33657
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33712
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33678
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33631
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33660
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33636
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio splendidus	R-33645
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio splendidus	R-33638
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio splendidus	R-33659
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio splendidus	R-33644
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio splendidus	R-33696
	Vibrio splendidus	REF FT cluster A50
	Vibrio splendidus	REF FT cluster A50
	Vibrio splendidus	REF FT cluster A50
	Vibrio splendidus	REF FT cluster A50
	Vibrio splendidus	REF FT cluster A50
	Vibrio splendidus	REF FT cluster A50
	Vibrio splendidus	REF FT cluster A50
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio splendidus	R-33654
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio crassostreae	R-33675
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio crassostreae	R-33695
uitbreiding databank	Vibrio crassostreae	LMG 22242
uitbreiding databank	Vibrio crassostreae	LMG 22249
uitbreiding databank	Vibrio crassostreae	LMG 22240T
	Vibrio crassostreae	VIB 239
	Vibrio crassostreae	R-20842
	Vibrio crassostreae	R-20841
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio crassostreae	R-33747
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio crassostreae	R-33630
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33750

37

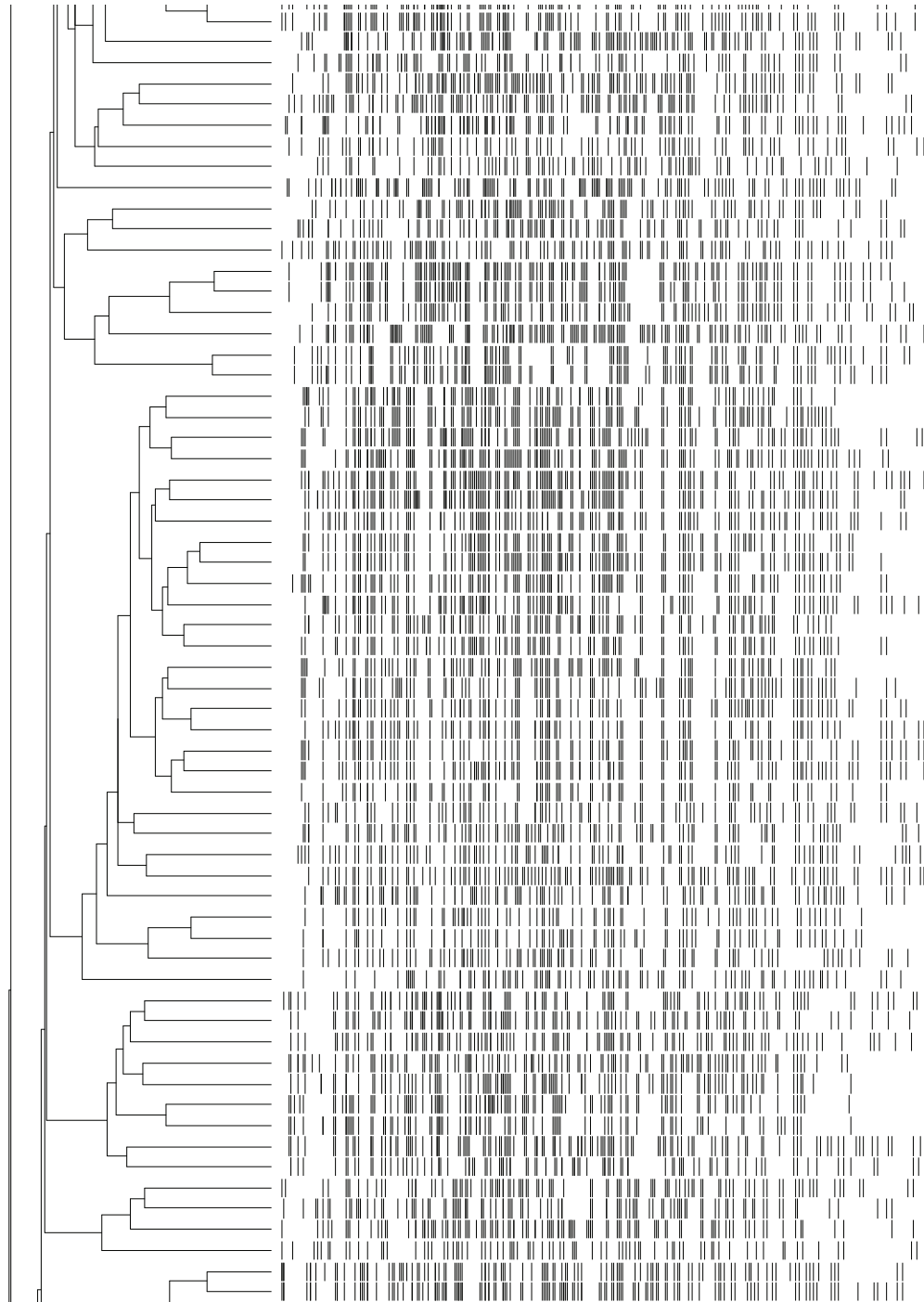
77

6

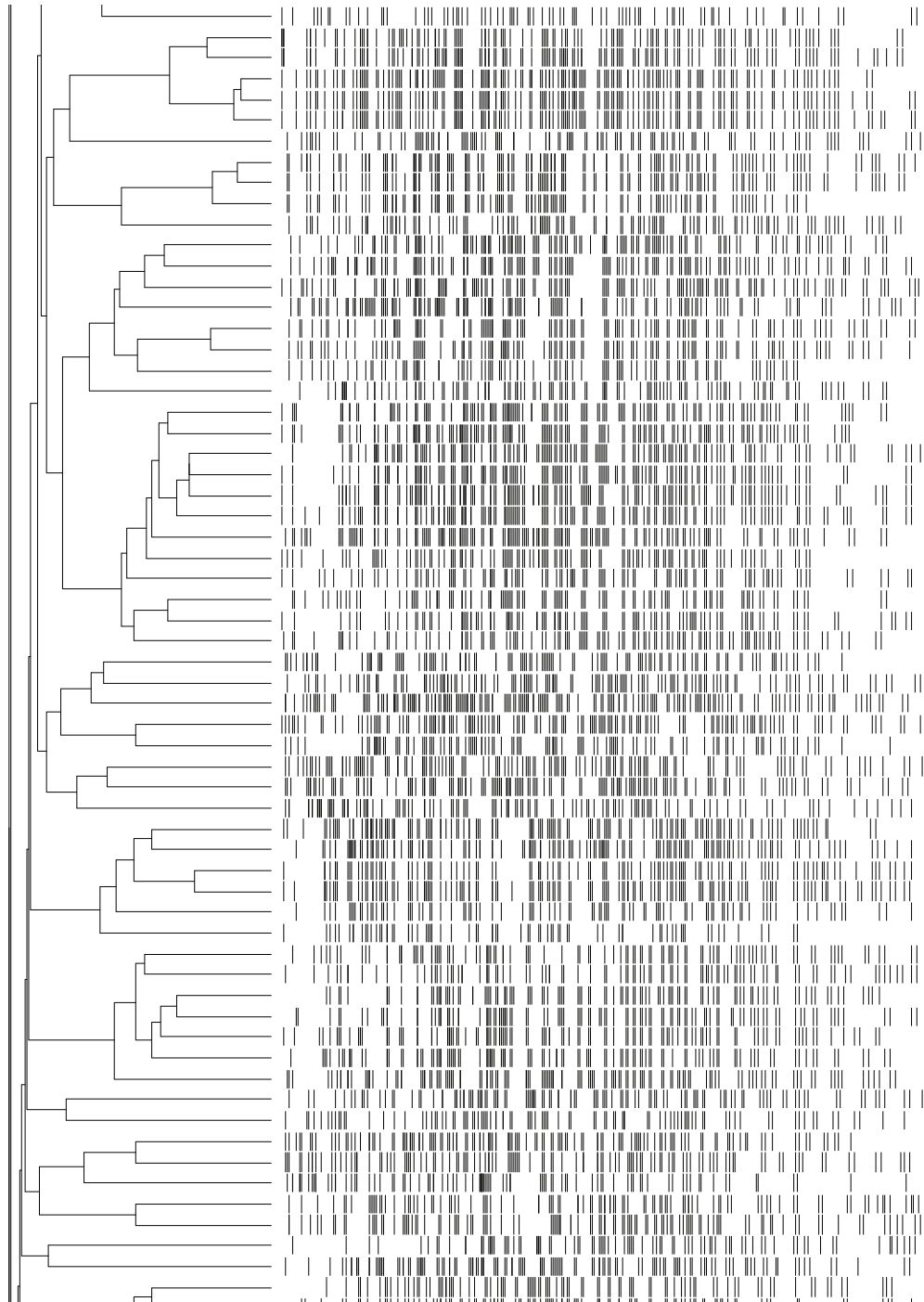
5

7

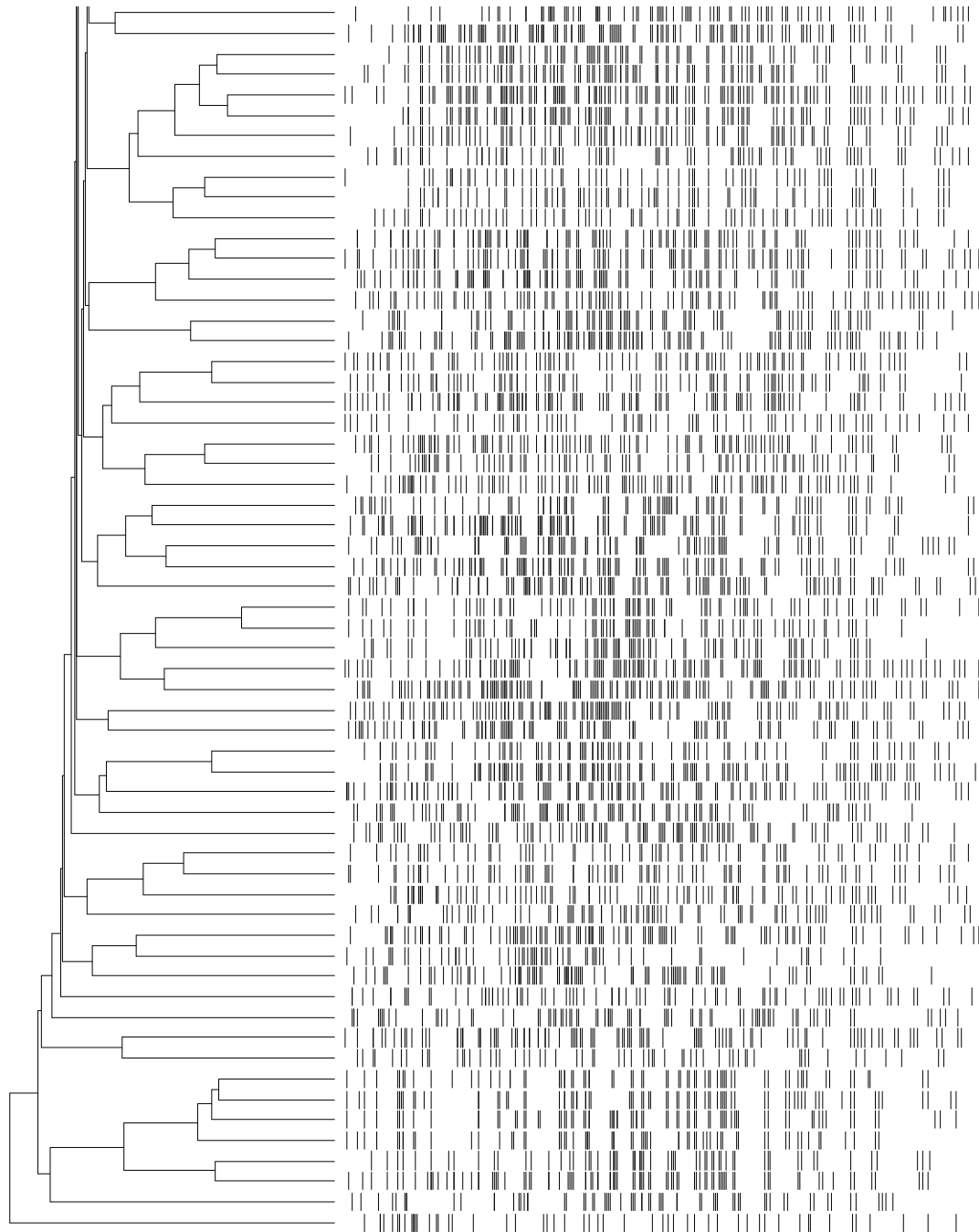
8



	<i>Vibrio crassostreae</i>		R-20841	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio crassostreae</i>		R-33747	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio crassostreae</i>		R-33630	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33750	9
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33768	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33635	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33665	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33731	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33692	16
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33753	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33634	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33765	
	<i>Vibrio lentus</i>	REF FT cluster A55	R-3895	14
	<i>Vibrio lentus</i>	REF FT cluster A55	R-3884	
	<i>Vibrio lentus</i>	REF FT cluster A55	R-3743	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio lentus</i>		R-33710	
	<i>Vibrio lentus</i>	REF FT cluster A55	R-3841	
	<i>Vibrio lentus</i>	REF FT cluster A55	R-3912	
	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	REF FT cluster A61	R-14874	
	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	REF FT cluster A61	FKFO 117	
	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	REF FT cluster A61	R-3761	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		R-33693	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		R-33694	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		R-33715	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		R-33713	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		R-33661	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		R-33714	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		R-33662	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		R-33653	
	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		R-14870	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		R-33655	
	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	REF FT cluster A61	VIB 505	19
	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	REF FT cluster A61	STD3-1018	
	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		R-20848	
	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		R-20852	
	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		R-20846	
	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		R-20847	
	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		R-20851	
	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		LMG 21359T	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		R-33663	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		R-33666	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		R-33671	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		R-33637	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		R-33732	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		R-33738	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		R-33761	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>		R-33641	
	<i>Vibrio chagasii</i>		R-20861	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio chagasii</i>		R-33658	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio chagasii</i>		R-33767	
	<i>Vibrio chagasii</i>	REF FT cluster A52	VIB 211	
	<i>Vibrio chagasii</i>	REF FT cluster A52	VIB 212	13
	<i>Vibrio chagasii</i>	REF FT cluster A52	VIB 193	
	<i>Vibrio chagasii</i>	REF FT cluster A52	VIB 192	
	<i>Vibrio chagasii</i>		R-20860	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio chagasii</i>		R-33633	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33754	26
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33656	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33752	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33736	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio tapetis</i>		R-33639	
LMG-R 60 (Roxana)	<i>Vibrio tapetis</i>		R-33628	22



LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33736	22
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio tapetis	R-33639	
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio tapetis	R-33628	
	Vibrio tapetis	B2.1	
	Vibrio tapetis	B9.3	
	Vibrio tapetis	LMG 19706T	24
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33672	
	Vibrio pectenicida	REF FT cluster A43	
	Vibrio pectenicida	REF FT cluster A43	
	Vibrio pectenicida	REF FT cluster A43	
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio pectenicida	R-33716	29
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio diabolicus	R-33706	
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio diabolicus	R-33708	
	Vibrio diabolicus	REF FT cluster A49	
	Vibrio diabolicus	FKFO 1	
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio diabolicus	R-33709	28
	Vibrio diabolicus	HE799	
	Vibrio diabolicus	REF FT cluster A49	
	Vibrio diabolicus	REF FT cluster A49	
	Vibrio diabolicus	REF FT cluster A49	
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio diabolicus	R-33748	28
	Vibrio alginolyticus	REF FT cluster A62	
	Vibrio alginolyticus	REF FT cluster A62	
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio alginolyticus	R-33705	
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio alginolyticus	R-33707	
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio alginolyticus	R-33703	36
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio alginolyticus	R-33698	
	Vibrio alginolyticus	REF FT cluster A62	
	Vibrio alginolyticus	INCO 32	
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio alginolyticus	LMG 4409T	
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio alginolyticus	R-33757	47
	Vibrio alginolyticus	REF FT cluster A62	
	Vibrio alginolyticus	REF FT cluster A62	
	Vibrio alginolyticus	REF FT cluster A62	
	Vibrio alginolyticus	REF FT cluster A62	
uitbreiding databank	Vibrio tubiashii	LMG 10936T	36
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio tubiashii	LMG 11229	
	Vibrio tubiashii	R-33720	
	Vibrio tubiashii	REF FT cluster A59	
	Vibrio tubiashii	REF FT cluster A59	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33674	47
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33686	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33740	
	Vibrio mediterranei	REF FT cluster A6	
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio mediterranei	LMG 11258T	
	Vibrio mediterranei	R-33749	55
	Vibrio mediterranei	TAR 1	
	Vibrio mediterranei	REF FT cluster A6	
	Vibrio mediterranei	REF FT cluster A6	
	Vibrio mediterranei	REF FT cluster A6	
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio mediterranei	R-33764	48
	Vibrio mediterranei	VIB419	
	Vibrio parahaemolyticus	R-25100	
	Vibrio parahaemolyticus	R-25109	
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio parahaemolyticus	R-33743	
	Vibrio parahaemolyticus	R-25115	48
	Vibrio parahaemolyticus	R-25107	
	Vibrio parahaemolyticus	R-25105	
	Vibrio parahaemolyticus	REF FT cluster A42	
	Vibrio parahaemolyticus	LMG 16874	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33719	48
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33626	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33664	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33625	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33624	
uitbreiding databank	Vibrio agarivorans	LMG 21448	48
uitbreiding databank	Vibrio agarivorans	LMG 21449T	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33632	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33623	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	R-33673	



LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33632	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33623	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33673	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33676	} 48
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33687	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33627	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33670	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33729	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33727	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33733	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33728	} 52
	Vibrio ichthyenteri	REF FT cluster A63	LMG 19664T	
	Vibrio ichthyenteri		VIB 640	
	Vibrio ichthyenteri	REF FT cluster A63	R-3885	} 53
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio ichthyenteri		R-33718	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33758	} 68
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33682	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33667	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33668	} 66
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33650	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33726	} 58
LMG-R 60 (Roxana)	Vibrio splendidus		R-33669	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33737	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33766	} 67
	Vibrio fischeri	REF FT cluster A15	LMG 44 12	
	Vibrio fischeri	REF FT cluster A15	LMG 44 14T	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33699	} 82
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33700	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified (maybe V..		R-33702	
	Listonella pelagia	REF FT cluster A10	LMG 3897T	} 86
	Listonella pelagia	REF FT cluster A10	STD3-1008	
	Listonella pelagia		LMG 11752	
uitbreiding databank	Unidentified		R-33680	} 67
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33681	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33717	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33689	} 82
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33685	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33688	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33640	} 86
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		LMG 19806T	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified	REF FT cluster A11	R-33711	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33730	} 82
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33735	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33739	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33652	} 86
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33741	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33742	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33746	} 82
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33734	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33629	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33721	} 86
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33723	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33759	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33697	} 82
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33756	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33755	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33763	} 86
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33701	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33744	
LMG-R 60 (Roxana)	Unidentified		R-33725	

### ANEXO III

Cepa (sinónimo)	Cluster de AFLP cluster e identificación	Grupo fenotípico e identificación	Lugar de aislamiento
LMG 23856 (R-33660)	5, no identificada	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	C
R-33631	5, no identificada	P2, <i>Vibrio splendidus II</i>	A
R-33657	5, no identificada	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	DRP
R-33678	5, no identificada	P8, <i>Vibrio natrieges</i>	A
R-33712	5, no identificada	P5, <i>Vibrio aestuarianus</i>	A
R-33636	5, no identificada	P2, <i>Vibrio splendidus II</i>	A
LMG 23852 (R-33642)	6, <i>Vibrio splendidus</i>	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	B
LMG 23853 (R-33648)	6, <i>Vibrio splendidus</i>	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	A
R-33643	6, <i>Vibrio splendidus</i>	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	DRP
R-33646	6, <i>Vibrio splendidus</i>	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	DRD
R-33647	6, <i>Vibrio splendidus</i>	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	C
R-33649	6, <i>Vibrio splendidus</i>	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	A
R-33651	6, <i>Vibrio splendidus</i>	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	A
R-33745	6, <i>Vibrio splendidus</i>	P24, <i>Vibrio pectenica</i>	A
R-33751	6, <i>Vibrio splendidus</i>	P7, <i>Vibrio fluvialis</i>	B
LMG 23851 (R-33638)	7, <i>Vibrio splendidus</i>	P2, <i>Vibrio splendidus II</i>	DRP
LMG 23854 (R-33654)	7, <i>Vibrio splendidus</i>	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	DRD
R-33644	7, <i>Vibrio splendidus</i>	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	DRD
R-33645	7, <i>Vibrio splendidus</i>	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	DRD
R-33659	7, <i>Vibrio splendidus</i>	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	A
R-33669	7, <i>Vibrio splendidus</i>	P4, <i>Vibrio diazotrophicus</i>	B
R-33696	7, <i>Vibrio splendidus</i>	P9, <i>Vibrio sp.</i>	DRP
LMG 23860 (R-33695)	8, <i>Vibrio crassostreae</i>	P15, <i>Vibrio cyclitrophicus</i>	DRD
R-33630	8, <i>Vibrio crassostreae</i>	P2, <i>Vibrio splendidus II</i>	B
R-33675	8, <i>Vibrio crassostreae</i>	P4, <i>Vibrio diazotrophicus</i>	DRP
R-33747	8, <i>Vibrio crassostreae</i>	P17, <i>Vibrio vulnificus</i>	C
LMG 23850 (R-33635)	9, no identificada	P2, <i>Vibrio splendidus II</i>	B
R-33665	9, no identificada	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	B
R-33731	9, no identificada	P10, <i>Vibrio pacinii</i>	B
R-33750	9, no identificada	P7, <i>Vibrio fluvialis</i>	C
R-33768	9, no identificada	P29, <i>Alivibrio wodanis</i>	B
LMG 23849 (R-33633)	13, <i>Vibrio chagasii</i>	P2, <i>Vibrio splendidus II</i>	A
LMG 23855 (R-33658)	13, <i>Vibrio chagasii</i>	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	C
R-33767	13, <i>Vibrio chagasii</i>	P11, <i>Vibrio lentus</i>	B
LMG 23863 (R-33710)	14, <i>Vibrio lentus</i>	P5, <i>Vibrio aestuarianus</i>	C
R-33634	16, no identificada	P2, <i>Vibrio splendidus II</i>	B
R-33753	16, no identificada	P7, <i>Vibrio fluvialis</i>	A
R-33765	16, no identificada	P11, <i>Vibrio lentus</i>	A
LMG 23857 (R-33671)	19, <i>Vibrio cyclitrophicus</i>	P4, <i>Vibrio diazotrophicus</i>	A
LMG 23859 (R-33694)	19, <i>Vibrio cyclitrophicus</i>	P15, <i>Vibrio cyclitrophicus</i>	DRP
R-33637	19, <i>Vibrio cyclitrophicus</i>	P2, <i>Vibrio splendidus II</i>	A
R-33641	19, <i>Vibrio cyclitrophicus</i>	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	C
R-33653	19, <i>Vibrio cyclitrophicus</i>	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	A
R-33655	19, <i>Vibrio cyclitrophicus</i>	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	DRP
R-33661	19, <i>Vibrio cyclitrophicus</i>	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	B

R-33662	19, <i>Vibrio cyclitrophicus</i>	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	DRP
R-33663	19, <i>Vibrio cyclitrophicus</i>	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	B
R-33666	19, <i>Vibrio cyclitrophicus</i>	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	B
R-33693	19, <i>Vibrio cyclitrophicus</i>	P15, <i>Vibrio cyclitrophicus</i>	C
R-33713	19, <i>Vibrio cyclitrophicus</i>	P5, <i>Vibrio aestuarianus</i>	C
R-33714	19, <i>Vibrio cyclitrophicus</i>	P18, <i>Vibrio nereis</i>	DRP
R-33715	19, <i>Vibrio cyclitrophicus</i>	P18, <i>Vibrio nereis</i>	C
R-33732	19, <i>Vibrio cyclitrophicus</i>	P10, <i>Vibrio pacinii</i>	A
R-33738	19, <i>Vibrio cyclitrophicus</i>	P21, <i>Vibrio pelagius II</i>	DRP
R-33761	19, <i>Vibrio cyclitrophicus</i>	P19, <i>Vibrio mytili</i>	DRD
R-33719	Unclustered	P16, <i>Vibrio ordalii</i>	DRD
R-33720	Unclustered	P16, <i>Vibrio ordalii</i>	C
R-33628	22, <i>Vibrio tapetis</i>	P12, <i>Vibrio tasmaniensis / Vibrio fortis</i>	A
R-33639	22, <i>Vibrio tapetis</i>	P20, <i>Vibrio tapetis</i>	A
R-33716	24, <i>Vibrio pectenica</i>	P18, <i>Vibrio nereis</i>	C
R-33656	26, no identificada	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	C
R-33736	26, no identificada	P10, <i>Vibrio pacinii</i>	DRP
R-33752	26, no identificada	P7, <i>Vibrio fluvialis</i>	DRP
R-33754	26, no identificada	P7, <i>Vibrio fluvialis</i>	DRD
LMG 23861 (R-33707)	28, <i>Vibrio alginolyticus</i>	P3, <i>Vibrio alginolyticus</i>	C
LMG 23870 (R-33757)	28, <i>Vibrio alginolyticus</i>	P9, <i>Vibrio sp.</i>	C
R-33698	28, <i>Vibrio alginolyticus</i>	P9, <i>Vibrio sp.</i>	B
R-33703	28, <i>Vibrio alginolyticus</i>	P13, <i>Aliivibrio fischeri / Aliivibrio logei</i>	B
R-33705	28, <i>Vibrio alginolyticus</i>	P3, <i>Vibrio alginolyticus</i>	B
LMG 23862 (R-33708)	29, <i>Vibrio diabolicus</i>	P3, <i>Vibrio alginolyticus</i>	DRD
LMG 23867 (R-33748)	29, <i>Vibrio diabolicus</i>	P17, <i>Vibrio vulnificus</i>	A
R-33706	29, <i>Vibrio diabolicus</i>	P3, <i>Vibrio alginolyticus</i>	B
R-33709	29, <i>Vibrio diabolicus</i>	P5, <i>Vibrio aestuarianus</i>	B
R-33623	Unclustered	P6, <i>Vibrio pelagius I / Vibrio superstes</i>	C
R-33692	Unclustered	P6, <i>Vibrio pelagius I / Vibrio superstes</i>	DRD
R-33717	Unclustered	P16, <i>Vibrio ordalii</i>	DRP
R-33680	Unclustered	P8, <i>Vibrio natrieges</i>	B
R-33681	Unclustered	P8, <i>Vibrio natrieges</i>	C
R-33674	36, no identificada	P4, <i>Vibrio diazotrophicus</i>	A
R-33686	36, no identificada	P6, <i>Vibrio pelagius I / Vibrio superstes</i>	B
R-33740	Unclustered	P28, <i>Vibrio agarivorans</i>	A
LMG 33858 (R-33677)	37, no identificada	P8, <i>Vibrio natrieges</i>	B
R-33679	37, no identificada	P8, <i>Vibrio natrieges</i>	A
R-33683	37, no identificada	P6, <i>Vibrio pelagius I / Vibrio superstes</i>	C
R-33684	37, no identificada	P6, <i>Vibrio pelagius I / Vibrio superstes</i>	A
R-33690	37, no identificada	P6, <i>Vibrio pelagius I / Vibrio superstes</i>	B
R-33691	37, no identificada	P6, <i>Vibrio pelagius I / Vibrio superstes</i>	B
R-33722	37, no identificada	P22, <i>Vibrio cincinnatiensis</i>	DRP
R-33741	Unclustered	P17, <i>Vibrio harveyi</i>	B

LMG 23868 (R-33749)	47, <i>Vibrio mediterranei</i>	P17, <i>Vibrio vulnificus</i>	A
LMG 23871 (R-33764)	47, <i>Vibrio mediterranei</i>	P24, <i>Vibrio mediterranei</i>	A
R-33624	48, no identificada	P2, <i>Vibrio splendidus II</i>	C
R-33625	48, no identificada	P12, <i>Vibrio tasmaniensis</i> / <i>Vibrio fortis</i>	A
R-33664	48, no identificada	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	C
LMG 23864 (R-33718)	52, <i>Vibrio ichthyenteri</i>	P16, <i>Vibrio ordalii</i>	DRP
R-33682	53, no identificada	P6, <i>Vibrio pelagius I</i> / <i>Vibrio superstes</i>	B
R-33758	53, no identificada	P9, <i>Vibrio sp.</i>	A
R-33673	Unclustered	P4, <i>Vibrio diazotrophicus</i>	B
R-33702	Unclustered	P13, <i>Vibrio fischeri</i> / <i>Vibrio logei</i>	DRD
R-33711	Unclustered	P5, <i>Vibrio aestuarianus</i>	DRD
R-33626	Unclustered	P12, <i>Vibrio tasmaniensis</i> / <i>Vibrio fortis</i>	C
LMG 23866 (R-33743)	55, <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	P17, <i>Vibrio harveyi</i>	C
R-33699	58, no identificada	P13, <i>Aliivibrio fischeri</i> / <i>Aliivibrio logei</i>	B
R-33700	58, no identificada	P13, <i>Aliivibrio fischeri</i> / <i>Aliivibrio logei</i>	A
R-33746	Unclustered	P17, <i>Vibrio vulnificus</i>	DRP
R-33685	67, no identificada	P6, <i>Vibrio pelagius I</i> / <i>Vibrio superstes</i>	DRP
R-33688	67, no identificada	P6, <i>Vibrio pelagius I</i> / <i>Vibrio superstes</i>	DRD
R-33640	Unclustered	P20, <i>Vibrio tapetis</i>	A
R-33650	68, no identificada	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	DRP
R-33667	68, no identificada	P4, <i>Vibrio diazotrophicus</i>	B
R-33668	68, no identificada	P4, <i>Vibrio diazotrophicus</i>	A
R-33672	Unclustered	P4, <i>Vibrio diazotrophicus</i>	B
R-33737	69, no identificada	P21, <i>Vibrio pelagius II</i>	B
R-33766	69, no identificada	P11, <i>Vibrio lentus</i>	DRD
LMG 23865 (R-33727)	70, no identificada	P14, <i>Vibrio scophthalmi</i>	C
R-33627	70, no identificada	P12, <i>Vibrio tasmaniensis</i> / <i>Vibrio fortis</i>	DRD
R-33670	70, no identificada	P4, <i>Vibrio diazotrophicus</i>	B
R-33673	70, no identificada	P4, <i>Vibrio diazotrophicus</i>	B
R-33676	70, no identificada	P4, <i>Vibrio diazotrophicus</i>	DRD
R-33687	70, no identificada	P6, <i>Vibrio pelagius I</i> / <i>Vibrio superstes</i>	DRD
R-33728	70, no identificada	P14, <i>Vibrio scophthalmi</i>	B
R-33729	70, no identificada	P14, <i>Vibrio scophthalmi</i>	A
R-33733	70, no identificada	P10, <i>Vibrio pacinii</i>	B
R-33760	77, no identificada	P19, <i>Vibrio mytili</i>	B
R-33762	77, no identificada	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	B
R-33632	Unclustered	P2, <i>Vibrio splendidus II</i>	C
R-33730	82, no identificada	P14, <i>Vibrio scophthalmi</i>	DRD
R-33735	82, no identificada	P10, <i>Vibrio pacinii</i>	DRD
R-33739	82, no identificada	P21, <i>Vibrio pelagius II</i>	DRD
R-33652	Unclustered	P1, <i>Vibrio splendidus I</i>	DRD
R-33704	Unclustered	P3, <i>Vibrio alginolyticus</i>	C
R-33734	Unclustered	P10, <i>Vibrio pacinii</i>	DRP

LMG 23869 (R-33755)	86, no identificada	P9, <i>Vibrio</i> sp.	DRP
R-33697	86, no identificada	P9, <i>Vibrio</i> sp.	C
R-33756	86, no identificada	P9, <i>Vibrio</i> sp.	A
R-33759	86, no identificada	P9, <i>Vibrio</i> sp.	A
R-33701	Unclustered	P13, <i>Aliivibrio fischeri</i> / <i>Aliivibrio logei</i>	DRD
R-33689	Unclustered	P6, <i>Vibrio pelagius</i> I / <i>Vibrio superstes</i>	DRP
R-33721	Unclustered	P22, <i>Vibrio cincinnatiensis</i>	DRD
R-33723	Unclustered	P22, <i>Vibrio cincinnatiensis</i>	B
R-33629	Unclustered	P12, <i>Vibrio tasmaniensis</i> / <i>Vibrio fortis</i>	C
R-33744	Unclustered	P24, <i>Vibrio pectenecida</i>	DRP
R-33724	Unclustered	P13, <i>Aliivibrio fischeri</i> / <i>Aliivibrio logei</i>	A
R-33742	Unclustered	P17, <i>Vibrio harveyi</i>	C
R-33725	Unclustered	P27, <i>Vibrio gallicus</i>	DRD

---

Orígenes de las cepas: A, Carril; B, Redondela; C, Vilaboa y D, Camariñas.

<sup>RD</sup>, *Ruditapes decussatus*, <sup>RP</sup>, *Ruditapes philippinarum*.



Especie / Cepa	LMG	CECT	Cl. AFLP	Nºacc 16rRNA	Nº acc <i>recA</i>	Nº acc <i>rpoA</i>	Nº acc <i>atpA</i>	Nº acc <i>pyrH</i>
<i>Vibrio</i> sp. VB 11.11	23856	7223	5	EF599163	EU541589	EU541569	x	x
<i>Vibrio</i> sp. VB 10.8	x	7225	26	EU541606	EU541591	EU541571	x	x
<i>Vibrio</i> sp. VB 11.8	23865	7226	70	EF599164	EU541588	EU541568	x	x
<i>Vibrio</i> sp. RD 8.15	23850	7224	9	EF599162	EU541590	EU541570	x	x
<i>Vibrio</i> sp. RD 9.17	x	x	16	EU541607	EU541592	EU541572	x	x
<i>V. breoganii</i> RD 15.11 <sup>T</sup>	23858 <sup>T</sup>	7222 <sup>T</sup>	37	EF599161	EU541585	EU541565	EU541550	EU889130
<i>V. breoganii</i> VB 16.3	x	x	37	EU541611	x	x	x	EU889132
<i>V. breoganii</i> C 5.5	x	x	37	EU541608	EU541595	EU541575	EU541552	EU889133
<i>V. breoganii</i> RD 2G5	24484	x	37	EU541609	EU541596	EU541576	EU541551	EU889134
<i>V. breoganii</i> RD 2B2	x	x	37	EU931113	x	x	x	x
<i>V. breoganii</i> C 4.15	x	x	37	EU931112	x	x	x	x
<i>V. breoganii</i> CMJ 13.7	x	x	37	EU541610	x	x	x	EU889131
<i>V. gallaecicus</i> VB 8.9 <sup>T</sup>	24045 <sup>T</sup>	7244 <sup>T</sup>	48	EU541605	EU541587	EU541566	EU541559	EU871963
<i>V. gallaecicus</i> VB 5.12	x	x	48	EU541613	EU931114	EU931118	EU931119	EU871965
<i>V. gallaecicus</i> C 8.10	x	x	48	EU541612	EU541582	EU541582	EU541560	EU871964
<i>A. finisterrae</i> CMJ 11.1 <sup>T</sup>	23869 <sup>T</sup>	7228 <sup>T</sup>	86	EU541604	EU541586	EU541567	EU541561	EU880126
<i>A. finisterrae</i> C13.19	x	x	86	EU541614	EU541583	EU541583	EU541562	EU889127
<i>A. finisterrae</i> VB 14.7	x	x	86	EU541615	EU931115	EU931116	EU931117	EU889128
<i>A. finisterrae</i> C 17.13	x	x	86	EU541616	EU541584	EU541584	EU541563	EU889129

<b>Especie</b>	<b>Código</b>	<b>N ° acc <i>recA</i></b>	<b>Nº acc <i>rpoA</i></b>	<b>Nº acc <i>atpA</i></b>	<b>Nº acc <i>pyrH</i></b>
<i>V. comitans</i>	LMG 23416 <sup>T</sup>	EU541597	EU541577	EU541553	EU71955
<i>V. rarus</i>	LMG 23674 <sup>T</sup>	EU541599	EU541578	EU541554	EU871956
<i>V. inusitatus</i>	LMG 23434 <sup>T</sup>	EU541600	EU541579	EU541555	EU871957
<i>V. gigantis</i>	DSM 18531 <sup>T</sup>	EU541593	EU541573	EU541556	EU871951
<i>V. crassostreae</i>	LMG 22240 <sup>T</sup>	EU541594	EU541574	EU541557	EU871948
<i>V. lentus</i>	CECT 5110 <sup>T</sup>	x	x	EU541558	EU871959
<i>V. gallicus</i>	LMG 21330 <sup>T</sup>	EU541601	EU541581	x	EU871950
<i>A. salmonicida</i>	NCIMB 2262 <sup>T</sup>	x	x	EU541564	x
<i>V. superstes</i>	LMG 21323 <sup>T</sup>	x	EU541580	x	EU871954
<i>V. ezurae</i>	DSM17533 <sup>T</sup>	x	x	x	EU871949
<i>V. halioticoli</i>	IAM 14596 <sup>T</sup>	EU871966	x	x	EU871952
<i>V. neonatus</i>	LMG 19972 <sup>T</sup>	x	x	x	EU871953
<i>V. cyclitrophicus</i>	LMG 21359 <sup>T</sup>	x	x	x	EU871634
<i>V. pomeroyi</i>	LMG 20537 <sup>T</sup>	x	x	x	EU871664
<i>V. tasmaniensis</i>	LMG 20012 <sup>T</sup>	x	x	x	EU871961
<i>V. splendidus</i>	LMG 19031 <sup>T</sup>	x	x	x	EU871962